

Untersuchungen
zur Frage der Beeinflußbarkeit
der DNS-Synthese in der Leber
durch Organhomogenate

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt an der Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

THEO SCHILLINGS
aus Neuss am Rhein

München 1971

1972

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Eder

UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE DER BEEINFLUSSBARKEIT
DER DNS-SYNTHESE IN DER LEBER DURCH ORGANHOMOGENATE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Theo Schillings
aus Neuss am Rhein

München 1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München



Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Eder

Dekan: Prof. Dr. med. W. Span

Tag der mündlichen Prüfung: 7. März 1972

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methode	4
	1. Material	4
	2. Operationsmethoden	4
	a) Teilhepatektomie	4
	b) Nephrektomie	4
	c) Intrakardiale Injektion	5
	d) Dauerinfusion	5
	3. Homogenatherstellung	7
	4. Verwendete radioaktive Verbindungen	8
	a) Thymidin	8
	b) Leucin	10
	5. Flüssigkeitsszintillationsmethode	10
	a) Prinzip	10
	b) Verbrennungstechnik	11
	c) Nulleffekt	12
	d) Messung	13
	6. Autoradiographie	14
	a) Technik	14
	b) Auswertung	15
III.	Versuchsbeschreibungen und Ergebnisse	17
	<u>Versuch A - Untersuchungen zur Frage der</u> <u>Beeinflußbarkeit der Leberregeneration</u> <u>teilhepatektomierter Ratten durch ein-</u> <u>malige Injektion von Leber- oder Nieren-</u> <u>homogenat zu verschiedenen Zeitpunkten</u> <u>nach der Operation</u>	17
	<u>Versuch B - Untersuchungen zur Frage der</u> <u>Beeinflußbarkeit der Leberregeneration</u> <u>teilhepatektomierter Ratten durch mehr-</u> <u>malige Injektion von Leber- oder Nieren-</u> <u>homogenat in dreistündigem Abstand nach</u> <u>der Operation</u>	21
	<u>Versuch C - Untersuchungen zur Frage der</u> <u>Beeinflußbarkeit der Leberregeneration</u> <u>teilhepatektomierter Ratten durch Dauer-</u> <u>infusion von Leber- oder Nierenhomogenat</u>	24

<u>Versuch D - Untersuchungen an Ratten zur Frage der Aufnahme von radioaktiv markiertem Leber- oder Nierenhomogenat in verschiedene Organe des Organismus</u>	35
--	----

IV. Besprechung der Ergebnisse	44
--------------------------------------	----

V. Zusammenfassung	54
--------------------------	----

VI. Literaturverzeichnis	57
--------------------------------	----

I. E I N L E I T U N G

Die Steuerung der Zellproliferation ist schon seit Jahren Gegenstand vieler Untersuchungen. Dennoch ist es bisher nicht gelungen, die Funktionsweise dieses für die Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichtes im Organismus notwendigen Steuerungsgefüges befriedigend aufzuklären. Während für die Regulation der Proteinsynthese schon einige recht wahrscheinliche Mechanismen gefunden wurden - es bewirkt zum Beispiel Laktose bei *E. coli* eine Neubildung von Enzymen, die die Verwertung des Substrates ermöglichen (Induktion) und Histidin bei *Salmonella typhimurium* eine Unterdrückung derjenigen Enzyme, die zur Synthese von Histidin erforderlich sind (Repression) (HOLZER 1963) - ist über die Steuerung von Zellpopulationen noch wenig bekannt. Ein möglicher Weg wurde von WEISS (1952) nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung aufgezeichnet. Diese Weiß'sche " Antitemplate "-Theorie ist schematisch in Abb. 1 wiedergegeben, in der die äußeren Quadrate die äußere Begrenzung eines Organismus darstellen, in dem wiederum schematisch zwei Organe eingezeichnet sind, eines durch einen großen Kreis, eines durch ein großes Quadrat. Die in dem großen Kreis bzw. Quadrat eingefügten kleinen Kreise bzw. Quadrate entsprechen den organspezifischen " Antitemplates ", die durch Punkte bzw. Kreuze markiert sind. Im normalen Zustand (Abb. 1A), in dem auf Grund der physiologischen Mauserung der Gewebe ein stetes, wenn auch sehr geringes " adaptives Wachstum " vonstatten geht, das der

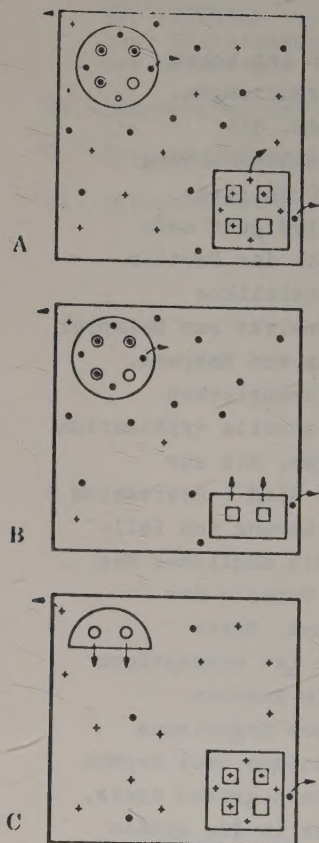


Abbildung 1: aus
GRUNDMANN und SEIDEL 1969
(Erläuterungen im Text)

" physiologischen Regeneration " dient, besteht nahezu ein Gleichgewicht zwischen den die Gewebe verlassenden und den im Organismus zerstörten oder ihn verlassenden " Antitemplates ". In Abb. 1B wurde ein Teil des als Quadrat gezeichneten Organs reseziert, in Abb. 1C ein Teil des als Kreis gezeichneten. Entsprechend der Menge des entfernten Gewebes vermindert sich im Organismus (im Blut oder in den übrigen extracellulären Flüssigkeiten) die Menge der organspezifischen "Antitemplates", der Hemmstoffe. Zugleich sind mehr Bindungsorte in den betroffenen Organen frei geworden; es resultiert ein kompensatorisches Wachstum des einen Organs, bis der Normalzustand der Abb. 1A wiederhergestellt ist (übernommen von GRUNDMANN und SEIDEL 1969).

Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit als Arbeitsgrundlage verwandt, mit dem Ziel, nähere Einblicke in den Mechanismus der Organregeneration zu gewinnen. Die regenerierende Leber nach partieller Hepatektomie diente als Modell für diese Untersuchungen.

II. MATERIAL und METHODE

1. Material

Als Versuchstiere dienten ausschließlich männliche Albinoratten vom SPF-Wistar-AF/HAN-Stamm, deren Gewicht 175 bis 195 g betrug; die "Spendertiere", deren Organe für die Homogenatherstellung verwendet wurden, wogen zwischen 200 und 230 g, was einem Alter von 7 - 8 Wochen entspricht. Da das Alter der Tiere Einfluß auf die Intensität der Leberregeneration hat (BUCHER und Mitarb. 1964), wurden, wenn möglich, Wurfgeschwister verwendet, in jedem Fall jedoch für einen Versuch Tiere gleichen Gewichtes. Als Narkosemittel diente Äther (Aethyläther pro narcosi, Farbwerke Hoechst), da dieser keine wesentlichen Veränderungen des Leberstoffwechsels bewirkt. Versuchs- und Kontrolltiere wurden hinsichtlich Ernährung (Altromin-Standardfutter, Wasser ad libitum), Käfiggröße und Raumtemperatur gleich behandelt.

2. Operationsmethoden

a) Teilhepatektomie

Nach medialem Hautschnitt und Eröffnung der Peritonealhöhle wurde der vordere und der linke laterale Lappen (entspricht nach WEINBREN und TARSH 1964 ungefähr $\frac{2}{3}$ der Gesamtleber) nach Ligatur am Leberhilus abgetragen (HIGGINS and ANDERSON 1931). Die Wunde wurde mit einer fortlaufenden Naht in zwei Schichten verschlossen.

b) Nephrektomie

Es wurde in der gleichen Weise wie bei der partiellen Hepatektomie die Bauchhöhle geöffnet,

jedoch zusätzlich zur besseren Übersicht des Operationsfeldes senkrecht zur Linea alba nach links lateral ein etwa 2 cm großer Hautschnitt gelegt. Nach Ablösen des umgebenden Nierenfettlagers und Abbinden der Vasa renalia wurde die linke Niere entfernt.

c) Intrakardiale Injektion

Nach linkem parasternalem Hautschnitt wurden die dort befindlichen Muskeln stumpf auseinandergezogen, so daß die Rippen und die Pulsation des Herzens sichtbar wurden. Mit Hilfe einer Tuberkulinspritze wurde das Homogenat langsam in das Herz injiziert.

d) Dauerinfusion

Zur Erweiterung der Blutgefäße wurde der Schwanz der Versuchsratte in lauwarmem Wasser erwärmt; anschließend wurden die Venen am Schwanzansatz durch Fingerdruck gestaut, so daß diese deutlich sichtbar wurden. Auf diese Weise konnte in der Regel die Punktionsnadel ohne Mühe in eine der beiden oberen Schwanzvenen eingeführt werden. Von der Verwendung gefäßerweiternder chemischer Mittel, wie zum Beispiel Xylol, wurde wegen der allgemein toxischen Wirkung Abstand genommen. Anschließend wurden die Ratten so in mit Spreu ausgelegte Käfige gesetzt, daß die Schwänze durch eine Bohrung mit Gummimanchette geführt und außerhalb des Käfigs mit Leukoplaststreifen fixiert werden konnten. Die Tiere erhielten so - trotz der Fixierung am Schwanz - eine geringe Bewegungsfreiheit, die im Gegensatz zur starren Fixierung

von den Tieren gut ertragen wurde.

An die Punktionsnadel wurde dann die Infusionsleitung angeschlossen, die zum Infusionsgerät (Fa. Braun-Melsungen Unita I Typ 71012) führte, das zur Kühlung des Homogenates in einem Kühlschrank (+ 4° C) stand.

Eine Fehlerquelle war nicht vollständig auszuschalten: Obwohl die Stempel der 50 ml-Glasspritzen des Dauerinfusionsgerätes mit Silikonfett abgedichtet wurden, schob sich immer etwas Homogenat am Stempel vorbei. Wenn die durch den Stempel nach außen gedrückte Homogenatmenge mehr als 4 cm³ bei 24-stündiger und 6 cm³ bei 36-stündiger Versuchsdauer betrug, wurde das Versuchstier aus der Wertung genommen.

Den Tieren wurde während der gesamten Infusionsdauer Wasser und Futter ad libitum angeboten. Diese Versuchsanordnung ermöglicht eine gleichmäßige Homogenatgabe über einen längeren Zeitraum, hat jedoch durch die Fixierung der Tiere den Nachteil des Stresses, dessen Einfluß auf die Regeneration nicht unterschätzt werden darf.

Die Versuchsratten nahmen, nach ihrem äußeren Verhalten zu urteilen, die Zwangsfixierung recht gelassen hin und machten vom Futter- und Wasserangebot Gebrauch. Welche Belastungen aber eine zwangsweise Fixierung auszulösen vermag, kann man aus Arbeiten BONFILS (1964) und BLUM (1968) ansehen; bei Ratten traten dort bei, allerdings totaler, Immobilisation über nur wenige Stunden Erosionen und Ulzera der Magenschleimhaut auf. Jedes Versuchstier erhielt 1 ml Homogenat bzw.

Hanks-Lösung pro Stunde infundiert; diese Menge entspricht ungefähr dem Flüssigkeitsbedarf der Tiere.

3. Homogenatherstellung

Die Entnahme der Organe und das Homogenisieren erfolgten unter sterilen Bedingungen. Das Homogenat wurde stets, auch während der Herstellung, entweder im Eisbad oder im Kühlschrank gekühlt.

Herstellung des im Versuch A verwendeten Homogenates

Leber und Nieren der Spendertiere wurden in Äthernarkose entfernt. Von den Nieren wurden die Nebennieren und größere Fett- und Bindegewebsanteile abpräpariert. Beide Organe wurden gewogen (Feuchtgewicht), mit einem Messer kleingeschnitten und mit der doppelten Gewichtsmenge Hanks-Lösung versetzt. Dieser Organbrei wurde darauf mit einem Stabhomogenisator (Ultra-Turrax der Firma Janke & Kunkel KG) mit maximal 40000 Umdrehungen pro Minute im Eisbad homogenisiert.

Herstellung des im Versuch B verwendeten Homogenates

Diese erfolgte wie soeben beschrieben mit dem Unterschied, daß hierbei der Organbrei nicht mit der doppelten, sondern mit der vierfachen Menge Hanks-Lösung versetzt wurde.

Herstellung des im Versuch C verwendeten Homogenates

Es wurde wiederum die gleiche Herstellungstechnik wie bei Versuch A beschrieben angewandt. Anschließend jedoch wurde die Hanks-Lösung auf die 8-fache Menge erhöht. Dann wurde dieses Homogenat in Cellulose-Nitrat-Röhrchen im Rotor No 30 in der Ultrazentrifuge Spinco L 50 bei 28000 Umdrehungen pro Minute bei $+ 2^{\circ} \text{C}$ zentrifugiert, was einer mittleren Beschleunigung von 65900 g entspricht. Dadurch werden Zellkerne, Mitochondrien und Lysomen mit Sicherheit abzentrifugiert (BUSCH 1967). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert.

Herstellung des im Versuch D verwendeten Homogenates

Es wurde das gleiche Herstellungsverfahren wie bei Versuch C gewählt. Der Organbrei wurde nach dem Homogenisieren im ersten Teil des Versuches mit der 8-fachen, im zweiten Teil des Versuches mit der 4-fachen Menge Hanks-Lösung versetzt. Ultrazentrifugiert wurde mit gleicher Umdrehungszahl wie in Versuch C, diesmal 45 Minuten lang.

4. Verwendete radioaktiv markierte Verbindungen

a) Thymin

Durch die Verwendung von radioaktiv markierten Verbindungen ist es möglich, Aussagen über den Stoffwechsel von Geweben zu machen. Für die Messung der DNS-Synthese-Aktivität eignet sich besonders Thymin, da es ein selektiver

Vorläufer der DNS ist (REICHARD and ESTBORN 1951). Es wurde Thymidin-6-T (The Radiochemical Centre Amersham) mit einer spezifischen Aktivität von 5000 mc/mM verwendet; Tritium hat als schwacher β -Strahler den Vorteil der geringen Reichweite der Strahlung. Jedes Versuchstier erhielt nach der vorher festgesetzten Versuchsdauer 200 μ C tritiiertes Thymidin, gelöst in 1 ml Salzlösung nach Hanks, intraperitoneal injiziert. Diese applizierte Menge liegt unter derjenigen, die bei teilhepatektomierten Tieren nach GRISHAM (1960) eine Hemmung der Leberregeneration hervorruft. Mit nur wenigen Ausnahmen (maximal $\pm$ 3 Minuten Differenz) wurden alle Tiere exakt eine Stunde später durch Nackenschlag getötet. Diese geringen Differenzen im Tötungszeitpunkt spielen für die Menge des eingebauten radioaktiven Materials keine Rolle, denn H^3 -Thymidin steht dem Organismus nur in den ersten 40 Minuten nach der Injektion zur Verfügung; das bedeutet, daß zu diesem Zeitpunkt der maximale Einbauwert bereits erreicht ist (MAURER und KOBURG 1961). Sofort anschließend wurde ausreichend Lebergewebe in 10%-iger Formalin-Lösung fixiert; Formalin ist besonders günstig, da es nur wenig in die DNS inkorporiertes Tritium-Thymidin aus dem Gewebe herauslöst (ANTONI und Mitarb. 1965). Zum Austausch des nicht in die DNS inkorporierten freien Thymidins wurde dem Fixans 0,1 mg/ml inaktives Thymidin zugesetzt. Außerdem wurden von jedem Organ, das für die Flüssigkeitsszintillationsmessung vorgesehen war, je zwei Gewebsteilchen auf vorbereitete Schälchen gelegt.

b) Leucin

Im Versuch C wurden die Spendertiere mehrmals mit L-Leucin-4,5- H^3 mit einer spezifischen Aktivität von 23500 mc/mM intraperitoneal gespritzt. Die Verbindung wird vom Peritoneum aus resorbiert, in den allgemeinen Leucin-Pool aufgenommen und zum überwiegenden Teil in Proteine eingebaut. Spritzt man das radioaktive Homogenat von Organen dieser Spendertiere, so läßt die Radioaktivitätsmessung Rückschlüsse auf die Verteilung des Homogenates im Organismus der Empfänger-tiere zu.

Um eine quantitative Aussage über die Aufnahme der radioaktiv markierten Verbindungen in die Organe machen zu können, wurde die Messung im Flüssigkeits-szintillationszähler und die Auszählung autoradio-graphischer Präparate durchgeführt.

5. Flüssigkeitsszintillationsmethode

a) Prinzip

Das Gewebe wird durch eine spezielle Verbrennungs-technik in CO_2 , H_2O und HTO - letzteres entsteht bei der Verbrennung von Tritium-haltigem Gewebe - über-geführt. Damit ist die für die Flüssigkeitsszintil-lationsmessung erforderliche Auflösung in den molekularen Bereich hinein erreicht, die notwendig ist, um den Löscheffekt gering zu halten. Diese Methode wurde erstmals von KALBERER und RUTSCHMANN (1961) zur Bestimmung von Isotopen in organischem Material angegeben.

b) Verbrennungstechnik

Die zu verbrennenden Gewebstückchen wurden auf bereits gewogene, mit etwa 1 x 1 cm großen aschefreien Filterpapierstückchen (Firma Carl Schleicher & Schüll, Marke Selecta No 589^c) ausgelegte Schälchen gelegt, dann bei ungefähr 70^o C etwa 3 - 4 Stunden lang getrocknet, so daß Gewichtskonstanz eintrat, und anschließend nochmals gewogen. Aus der Differenz der beiden Wägungen konnte das Gewicht der Organstückchen ermittelt werden. Als Verbrennungskolben dienten 1 Liter Duranglas-Rundkolben mit Schliffstopfen, die im unteren Teil einen Ansatzstutzen von 9 cm Länge und einem Lumen von 2 cm tragen. Im Schliffstopfen sind 2 Platindrähte eingeschmolzen, von denen einer nach außen durchgeführt ist und am kolben-seitigen Ende einen Platinkorb mit nach oben gerichteter Öffnung trägt, während der zweite Platindraht bis in Höhe des Korbes führt (übernommen von RABES 1967). Die Organstückchen wurden mit dem an ihnen haftenden Filterpapier in Gelatine kapseln (Parke Davis Nr. 5) eingeschlossen, mit dem gleichen aschefreien Filterpapier eingedreht und so in den Platinkorb eingelegt, daß das Ende des Filterpapierstreifens den Platindraht berührt, der durch den Schliffstopfen nach außen durchgeführt ist. Der Papierstreifen wurde zur besseren Zündung mit 1 - 2 Tropfen Methanol befeuchtet. In den Ansatzkolben wurde als Vorlageflüssigkeit 10 ml Methanol pro analysi pipettiert und dieser im Trockeneisbad gekühlt,

um bei der nachfolgenden Verbrennung eine Entzündung des Methanols zu verhindern. Nach dem Durchspülen des Kolbens mit reinem Sauerstoff wurde das Gefäß mit dem Stopfen verschlossen und über den nach außen durchgeführten Platindraht mit Hilfe eines Hochfrequenz-Vacuum-Prüfgerätes der Firma Leibold (VP 23) durch Teslaströme die Verbrennung ausgelöst. Danach wurde der Kolben noch einige Minuten gekühlt und nach dem Erwärmen durch die Raumtemperatur geschüttelt, damit sich das Oxydationswasser in der Vorlageflüssigkeit löste. Von der Kolbenflüssigkeit wurden 5 ml abpipettiert und zusammen mit 15 ml Szintillator nach BRAY (1960) in ein Glasgefäß zur Messung im Flüssigkeits-szintillationszähler gegeben. Die Meßproben enthielten also nur jeweils die Hälfte der in den Gewebeproben enthaltenen Radioaktivität, was bei der Ausrechnung Berücksichtigung fand. Die gebrauchten Gefäße wie Kolben, Einsätze und Pipetten wurden gründlich in Wasser und 96%-igem Alkohol gespült und schließlich im Trockenschrank getrocknet; danach konnten sie wieder verwendet werden.

c) Nulleffekt

Zur Bestimmung des Nulleffektes wurden bei jeder Verbrennungsreihe drei Proben ohne radioaktives Material als Leerwerte in gleicher Weise verbrannt. Die durch Messung ermittelten Leerwerte des I. und II. Kanals wurden von den entsprechenden Werten der radioaktiven Proben abgezogen.

d) Messung

Die bei der β -Strahlung des Tritiums freiwerdende Energie der emittierten Elektronen ist nicht einheitlich; es liegt vielmehr ein Energiespektrum zwischen Null und einer für Tritium charakteristischen maximalen Energie vor. Durch Messung in zwei Kanälen werden unterschiedliche Bereiche aus diesem Spektrum bestimmt; dadurch gelingt es, den Lösch-effekt zu ermitteln. Für die Messung wurde das Gerät der Firma Pachard Tricarb Modell 3214 benutzt, das bei 2190 Volt arbeitete. Die Temperatur in der Zählkammer betrug 12°C , die Meßzeit meist 3×10 Minuten; im ersten Teil des Versuches C wurde 1×100 , im zweiten Teil 5×10 Minuten gemessen. In Kanal I, dessen Impulshöhendiskriminator auf 70 - 1000 begrenzt wurde, wird bei der gewählten Einstellung praktisch das gesamte für Tritium typische Energiespektrum gemessen, während Kanal II so eingestellt wurde, daß nur ungefähr 10 % der Impulse von Kanal I bestimmt wurden (Diskrimi-natoreinstellung 460 - 1000). In beiden Kanälen wurde mit 50 %iger Verstärkung gemessen. Mit Hilfe von Standardproben mit bekannten gleichen Impulsraten, aber verschieden großem Lösch-effekt wurden - für jede Meßgruppe getrennt - Eichkurven gezeichnet (BAILLIE 1960). Das Verhältnis entsprechender Werte beider Meßkanäle wurde gegen die Ausbeute aufgetragen. Die Quotienten von I und II der Versuchsproben konnten dann jeweils einem Punkt der Standardkurve zugeordnet werden. Die so ermittelte Ausbeute betrug zwischen 5 und 8 % und diente zur Berechnung der Zerfälle

pro Zeiteinheit. Zur Vermeidung von Nebeneffekten durch Photoluminiszenz wurde die Zählkammer stets geschlossen gehalten und der erste Durchgang der Messung nicht ausgewertet.

Da immer zwei Gewebsteilchen von jedem Organ entnommen wurden, sind die in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Ergebnisse der Flüssigkeits-szintillationsmessung Mittelwerte zweier Proben.

6. Autoradiographie

Thymidin wird von der Zelle während der 6 - 8-stündigen DNS-Synthese-Zeit eingebaut (SCHULTZE und OEHLERT 1960; KOBURG und SCHULTZE 1961); deshalb werden nur diejenigen Zellen markiert, die sich während der Verfügbarkeitszeit des Thymidins in der DNS-Synthese-Phase befinden.

a) Technik

Nach Fixierung des Lebergewebes in 10%-iger Formalin-Lösung wurden Paraffinschnitte von 4 μ Dicke angefertigt und mit Stripping Film Kodak AR 10 (Versuch B und nephrektomierte Tiere des Versuches A), Emulsion K 2, Ilford (Versuch C) oder Emulsion G 5, Ilford (hepatektomierte Tiere des Versuches A) überschichtet. Im Prinzip arbeiten diese autoradiographischen Emulsionen ähnlich einem photographischen Film. Statt durch Lichtabsorption kommt es durch die radioaktive Strahlung zur Bildung freier Elektronen, durch die Silberbromid in metallisches Silber überführt wird. Je nach Emulsion wurden die histologischen Schnitte zwischen 6 und 26 Tagen

bei konstanter Temperatur von 4°C exponiert. Nach dem Entwickeln (Amidol, Na_2SO_3 , KBr), dem Fixieren mit Natriumthiosulfat und dem Auswässern des Fixiersalzes wurden die Autoradiogramme mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Bedingt durch die geringe Energie der β -Strahlung ist die Schwärzung der Emulsion auf eine etwa $1 - 2\ \mu$ dicke, dem histologischen Schnitt zugewandte Schicht begrenzt; auch vom Schnitt selbst trägt nur eine Schicht von etwa der gleichen Dicke zum autoradiographischen Bild bei. Dadurch werden markierte Zellen in einem größeren Abstand vom Film als die Reichweite der radioaktiven Strahlung im Gewebe entspricht, nicht erfaßt, so daß der Markierungsindex für Zellen in tieferen Schichten eines Schnittes stets zu niedrig ausfällt. Dies ist bei der Deutung der Ergebnisse zu berücksichtigen. Die Gleichmäßigkeit der Emulsionsschicht ist bei Tritiummarkierung ohne Bedeutung, solange die Schicht an jeder Stelle dicker als die praktische Reichweite der β -Strahlung von $1 - 2\ \mu$ ist. Dies ist bei der gewählten Technik jedoch immer gewährleistet. Da bei der histologischen Auswertung nur vergleichend-qualitative, jedoch keine absolut-quantitativen Aussagen gemacht werden, spielen der sogenannte Fading-Effekt, unter dem man das Auslöschen latenter Bilder versteht, und auch die β -Selbstabsorption (MAURER und PRIMBSCH 1964) keine wesentliche Rolle.

b) Auswertung

Zur Ermittlung des Markierungsindex wurde in 30 bis 60 Gesichtsfeldern die durchschnittliche Anzahl von

Leberparenchymzellen pro Gesichtsfeld bestimmt. Hierauf wurde dann diejenige Anzahl von Gesichtsfeldern auf markierte Zellen in mäanderförmiger Weise durchgemustert, die unter Berücksichtigung dieser durchschnittlichen Zellenzahl 10000 Gesamtzellen ergeben. Wenn der Zellendurchschnitt stark schwankte, wurde das betreffende Präparat auf 10000 Zellen durchgezählt. Die Auswertung erfolgte mit einem binokularen Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung (Objektiv 100 x, Okular 10 x, Ölimmersion). Die Auswertungsmethode beruht auf der Tatsache, daß die markierten Zellen in allen Leberlappen, die nach der Teilhepatektomie im Organismus verblieben sind, gleichmäßig verteilt sind (SCHULTZE and OEHLERT 1960; GRISHAM 1962). Dieses wird auch dadurch belegt, daß bei Tieren, denen nach Teilhepatektomie H^3 -Thymidin dauerinfundiert wurde, die weitaus überwiegende Mehrzahl aller Leberparenchymzellen an der Regeneration beteiligt ist (STÖCKER 1966).

Nach Markierung mit tritiiertem Thymidin in verschiedenen Abständen nach Teilhepatektomie sind innerhalb der Leberlobuli topische Unterschiede in der Höhe des Mitoseindex zu beobachten (RABES und TUCZEK 1970). Durch Auszählung von 10000 Zellen in mäanderförmigem Zählgang ergibt sich jedoch ein verwertbarer mittlerer Mitoseindex der Gesamtheepatocytenpopulation.

III. VERSUCHSBESCHREIBUNGEN UND ERGEBNISSE

VERSUCH A

Untersuchungen zur Frage der Beeinflußbarkeit der Leberregeneration teilhepatektomierter Ratten durch einmalige Injektion von Leber- oder Nierenhomogenat zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation:

Dieser Versuch soll aufzeigen, ob die Gabe von Homogenat die Leberregeneration beeinflußt und ob der Zeitpunkt der Homogenatinjektion für die Wirkung entscheidend ist.

Versuchsbeschreibung:

Teilhepatektomierten bzw. nephrektomierten Ratten wurden 15 Minuten, 2 Stunden oder 8 Stunden nach der Operation 2 ml des beschriebenen Leber- bzw. Nierenhomogenates intraperitoneal injiziert. 2 nephrektomierte Tiere erhielten als Kontrolle kein Homogenat. Alle Versuchstiere wurden zwischen 11 und 15 Uhr operiert; am nächsten Tag wurde ihnen um die gleiche Zeit das radioaktive Thymidin verabreicht. Es wurden nur autoradiographische Untersuchungen der Leber durchgeführt.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse nach Teilhepatektomie sind in der Abbildung 2 dargelegt. Es ist daraus ersichtlich, daß Injektion von Leberhomogenat höhere H^3 -Markierungsindices bei den Tieren bewirkt, die 2 oder 8 Stunden nach der Operation mit Leberhomogenat behandelt wurden, als bei den ent-

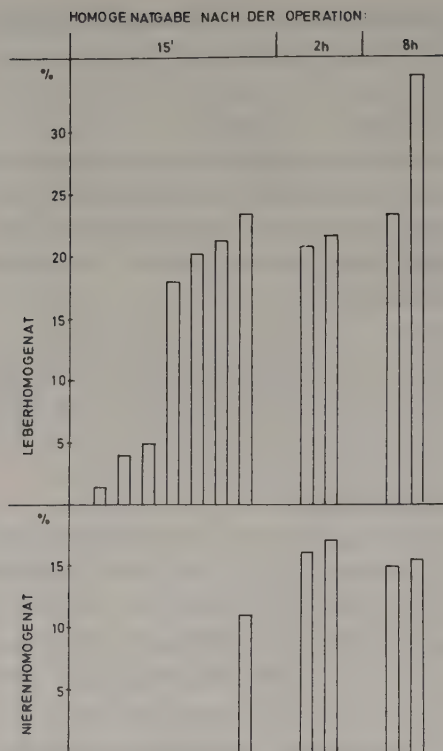


Abbildung 2: Markierungsindices von Leberparenchymzellen (% Thymidin- H^3 markierter Hepatocyten) teilhepatektomierter Ratten 24 Stunden nach der Operation, denen 15 Minuten, 2 Stunden oder 8 Stunden nach 2/3-Hepatektomie Leber- oder Nierenhomogenat injiziert wurde.

sprechenden Tieren, denen Nierenhomogenat injiziert wurde. Bei der Verabreichung von Leberhomogenat 15 Minuten nach der Operation sind die Ergebnisse sehr unterschiedlich. Von den 7 Tieren, die so

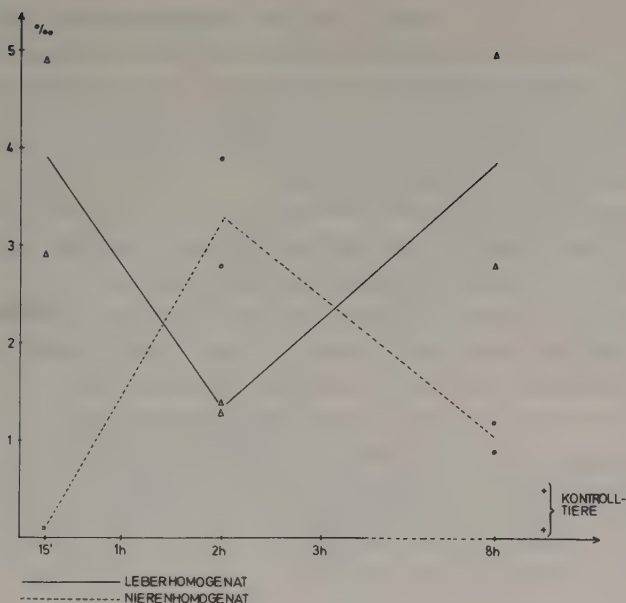


Abbildung 3: Markierungsindices von Leberparenchymzellen (o/oo Thymidin- H^3 markierter Hepatocyten) nephrektomierter Ratten 24 Stunden nach der Operation, denen 15 Minuten, 2 Stunden oder 8 Stunden nach unilateraler Nephrektomie Leber- oder Nierenhomogenat injiziert wurde. Die Kontrolltiere wurden lediglich operiert.

behandelt wurden, fand sich bei drei Ratten ein Markierungsindex unter 5 %, während der der anderen Tiere zwischen 17 und 23 % liegt; es wird also teilweise ein stark hemmender Einfluß erkennbar. Der Zeitpunkt der Homogenatgabe scheint nach diesen Ergebnissen für Nierenhomogenat keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die DNS-Synthese-

Aktivität zu besitzen, während Leberhomogenat mit zunehmendem zeitlichem Abstand der Homogenatgabe von der Operation einen fördernden Effekt zeigt.

Die Zahl der markierten Leberparenchymzellen nach Nephrektomie ist gering (Abb. 3). Die H^3 -Markierungsindices der Leber sind jedoch mit Ausnahme des einen Tieres, dem 15 Minuten post operationem Nierenhomogenat injiziert wurde, höher als die Werte der Kontrolltiere. Die Gabe von Leberhomogenat 15 Minuten nach der Operation ergibt eine größere DNS-Synthese-Aktivität als die Verabreichung von Nierenhomogenat; die 2-Stunden-Werte ergeben eine umgekehrte Relation, während die Homogenatgabe 8 Stunden nach der Operation etwa gleiche Verhältnisse wie bei den 15-Minuten-Werten erkennen lassen.

V E R S U C H B

Untersuchungen zur Frage der Beeinflußbarkeit der Leberregeneration teilhepatektomierter Ratten durch mehrmalige Injektion von Leber- oder Nierenhomogenat in dreistündigem Abstand nach der Operation:

Wie beim vorherigen Versuch sollte die Wirksamkeit von Homogenaten auf die Regeneration der Leber untersucht werden. Das Homogenat wurde diesmal den Tieren jedoch mehrmals über verschieden lange Zeiträume verabreicht, um eine länger andauernde Wirkung zu erzielen.

Versuchsbeschreibung:

Je zwei teilhepatektomierten Ratten wurde mehrmals in dreistündigem Abstand Leber- bzw. Nierenhomogenat verabreicht. Die erste Homogenatgabe erfolgte exakt 15 Minuten nach der Beendigung der Operation und wurde alle 3 Stunden wiederholt. 15, 20, 25 oder 30 Stunden nach der Leberresektion wurde radioaktives Thymidin injiziert. 60 Minuten später wurde die Leber entnommen. Die letzte Homogenatgabe erfolgte nicht mehr, wenn sie eine Stunde vor der Thymidingabe hätte vorgenommen werden müssen. Als Kontrolltiere dienten in jeder Gruppe Versuchstiere, die lediglich teilhepatektomiert wurden. Um den Tieren stets ein frisches Homogenat verabreichen zu können, wurde es insgesamt siebenmal neu zubereitet. Alle Versuchstiere wurden am selben Nachmittag innerhalb von 5 Stunden operiert; die Tötungszeiten sind durch die unterschiedliche Versuchsdauer über den Tag verteilt. Auch diesmal wurden nur autoradiographische Untersuchungen an der Leber durchgeführt.

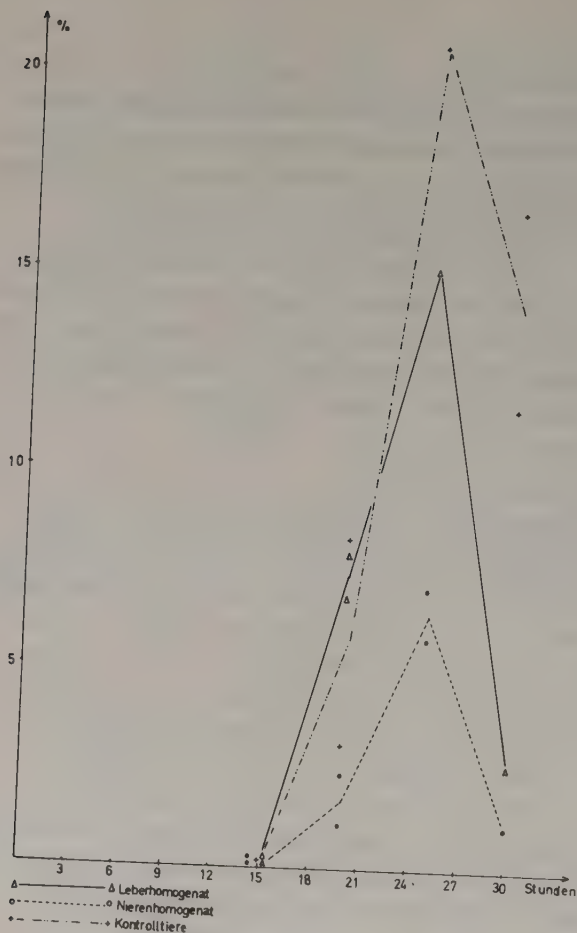
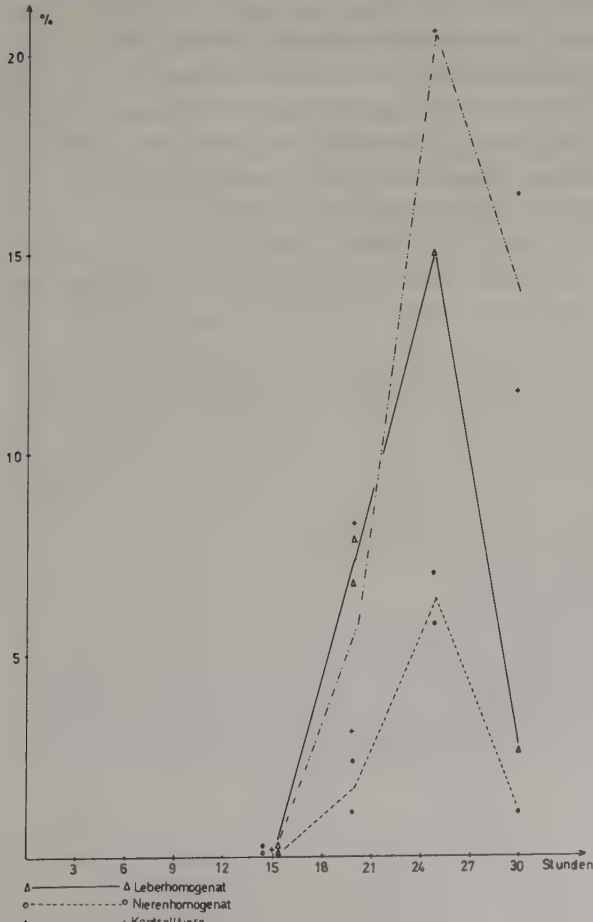


Abbildung 4: Markierungsindizes von Leberparenchymzellen teilhepatektomierter Ratten, denen 15 Minuten nach der Operation und anschließend im Abstand von 3 Stunden Leber- bzw. Nierenhomogenat verabreicht wurde; die Tiere wurden 15, 20, 25 und 30 Stunden nach der Operation mit Thymidin- H^3 injiziert und 60 Minuten später getötet. Die Kontrolltiere wurden lediglich teilhepatektomiert.

Ergebnisse:

Aus der Abbildung 4 ist zu ersehen, daß die Tiere, denen Homogenat injiziert wurde, einen niedrigeren Markierungsindex aufweisen als die entsprechenden Kontrolltiere. Es ist dabei auffallend, daß Nierenhomogenat einen stärker hemmenden Effekt auf die DNS-Synthese-Aktivität der Leber aufweist als Leberhomogenat; diese Hemmung ist besonders deutlich bei den 25- und 30-Stunden-Werten. Da zwei Versuchstiere nach der 2. bzw. 4. Injektion verstorben sind, enthält die Kurve nur je einen Wert für diejenigen Tiere, die mit Leber- oder Nierenhomogenat über einen Zeitraum von 30 Stunden behandelt worden sind.



V E R S U C H C

Untersuchungen zur Frage der Beeinflußbarkeit der Leberregeneration teilhepatektomierter Ratten durch Dauerinfusion von Leber- oder Nierenhomogenat:

Um eine gleichmäßige Wirkung des Homogenates über einen längeren Zeitraum zu erreichen, wurden die Tiere mit abgestuften Homogenatkonzentrationen und mit Hanks-Lösung dauerinfundiert.

Versuchsbeschreibung:

Teilhepatektomierte und scheinoperierte Ratten wurden 24 oder 36 Stunden lang mit Leber- oder Nierenhomogenat abgestufter Konzentration dauerinfundiert. Folgende Konzentrationen wurden verwandt:

- 1) der nach dem Ultrazentrifugieren gewonnene Überstand, dessen Herstellungstechnik im vorherigen Abschnitt besprochen wurde, im folgenden 1/1 Lösung genannt
- 2) der Überstand wurde mit der gleichen Menge Hanks-Lösung versetzt, 1/2 Lösung
- 3) der Überstand wurde mit der vierfachen Menge Hanks-Lösung versetzt, 1/4 Lösung
- 4) der Überstand wurde mit der achtfachen Menge Hanks-Lösung versetzt, 1/8 Lösung
- 5) der Überstand wurde mit der 16-fachen Menge Hanks-Lösung versetzt, 1/16 Lösung
- 6) für die Kontrolltiere wurde reine Hanks-Lösung verwandt.

Um den Einfluß der Tagesperiodik (JAFFE 1954; PETERS 1962) auf die Regeneration gering zu halten, wurden die Versuchstiere um die Mittagszeit getötet, so daß bei 36-stündiger Versuchsdauer nachts operiert werden mußte.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse von Lebergewebe der teilhepatektomierten Tiere sind in den Abbildungen 5 - 8 in Form von Säulengraphiken dargestellt. Auffällig ist, daß die Werte stark streuen, besonders bei Verabreichung von Leberhomogenat. Bei 24-stündiger Dauerinfusion mit Leberhomogenat liegen die Markierungsindices der Hepatocyten bei einem Mittelwert von 12 - 14 % (Abb. 5 und Tab. 1). Nierenhomogenat bewirkt im Durchschnitt gesehen eine niedrigere DNS-Synthese-Aktivität (Abb. 6 und Tab. 1). Die Gabe von Hanks-Lösung weist gegenüber allen Konzentrationen beider Homogenatarten einen höheren Markierungsindex der Hepatocyten auf (Abb. 5 und Tab. 1). Es wird also auch hier die Tendenz sichtbar, daß sowohl Leber- als auch Nierenhomogenat eine hemmende Wirkung auf die Regeneration des Lebergewebes nach Teilhepatektomie ausüben, wobei der hemmende Effekt von Leberhomogenat schwächer ist.

Bei 36-stündiger Dauerinfusion zeigt sich ein anderes Bild. Bis auf den Mittelwert von Versuchen mit 1/16 Leberhomogenat weisen die Markierungsindices mit zunehmender Verdünnung des Homogenates fallende Tendenz auf (Abb. 7 und Tab. 1). Bei Nierenhomogenat ist dasselbe festzustellen, im Mittel liegen die Werte jedoch höher (Abb. 8 und Tab. 1). Während bei den 24-Stunden-Werten bei Verabreichung eines Homogenates eine Hemmwirkung gegenüber dem Hanks-Wert auftritt, ist bei der 36-stündigen Infusion eine fördernde Wirkung festzustellen (Abb. 7 und Tab. 1).

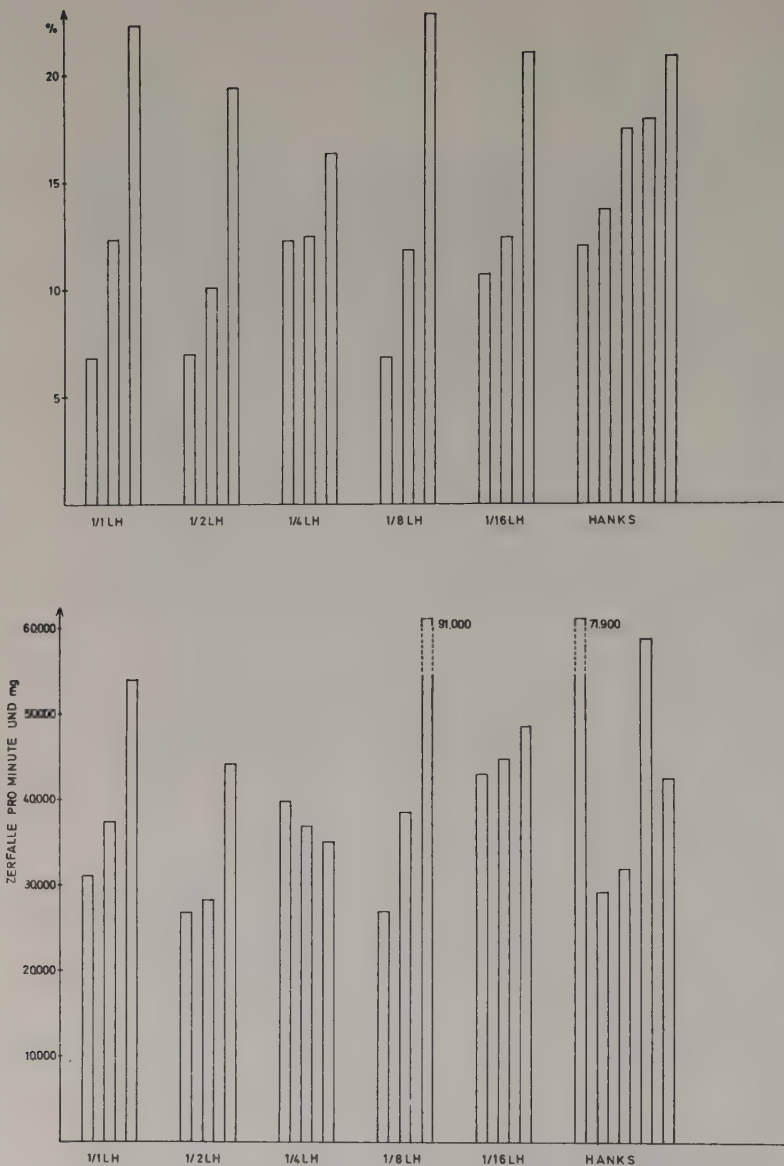


Abbildung 5: Markierungsindices (Prozentsatz markierter Hepatocyten) - oben - und Zerfälle pro Minute und Milligramm Trockengewicht - unten - von Lebergewebe teilhepatektomierter Ratten, die 24 Stunden lang mit abgestuften Konzentrationen von Leberhomogenat oder Hanks-Lösung dauerinfundiert wurden. Injektion von Thymidin- H^3 60 Minuten vor Tötung der Tiere.

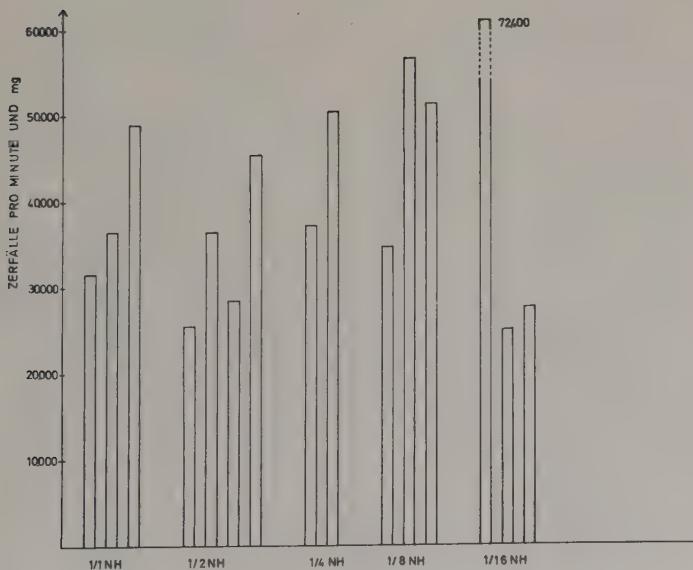
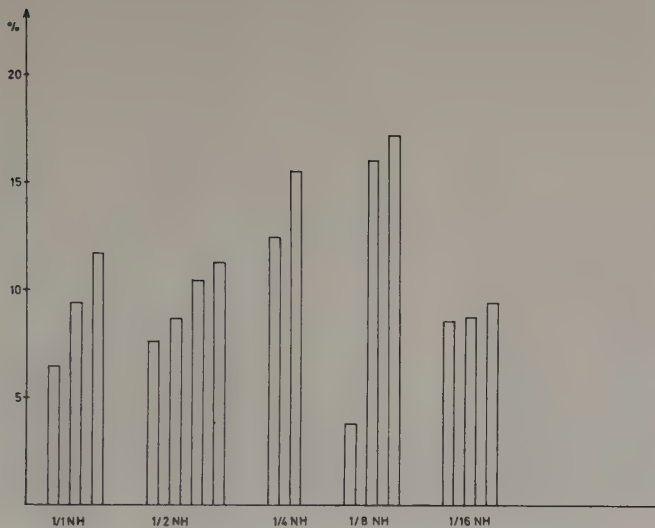


Abbildung 6: Markierungsindizes (Prozentsatz markierter Hepatocyten) - oben - und Zerfälle pro Minute und Milligramm Trockengewicht - unten - von Lebergewebe teilhepatektomierter Ratten, die 24 Stunden lang mit abgestuften Konzentrationen von Nierenhomogenat dauerinfundiert wurden. Injektion von Thymidin- H^3 60 Minuten vor Tötung der Tiere.

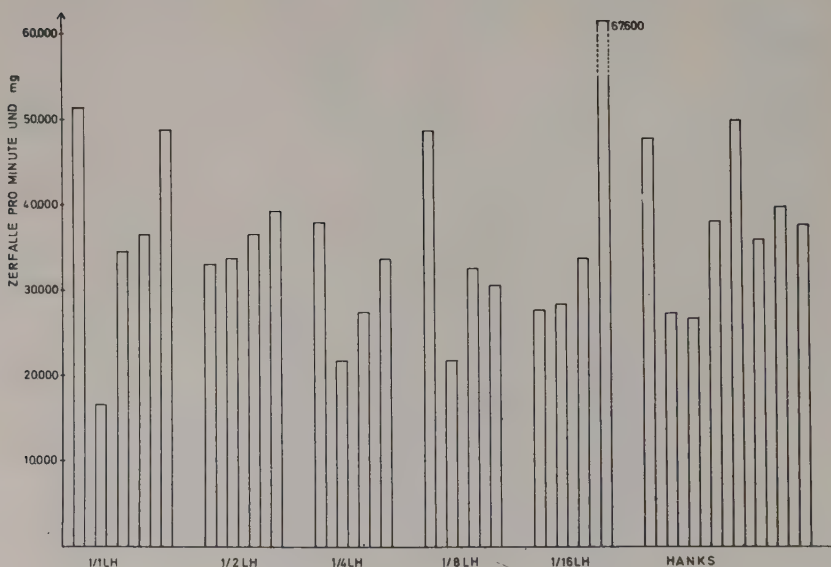
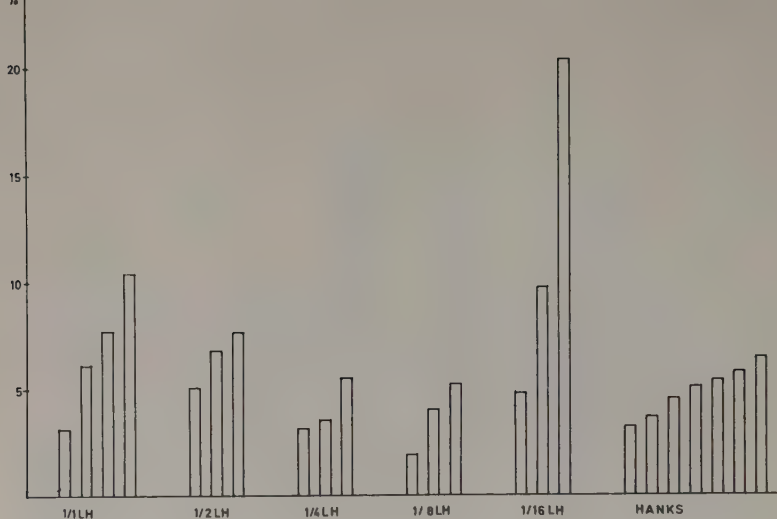


Abbildung 7: Markierungsindices (Prozentsatz markierter Hepatocyten) - oben - und Zerfälle pro Minute und Milligramm Trockengewicht - unten - von Lebergewebe teilhepatektomierter Ratten, die 36 Stunden lang mit abgestuften Konzentrationen von Leberhomogenat oder Hanks-Lösung dauerinfundiert wurden. Injektion von Thymidin- H^3 60 Minuten vor Tötung der Tiere.

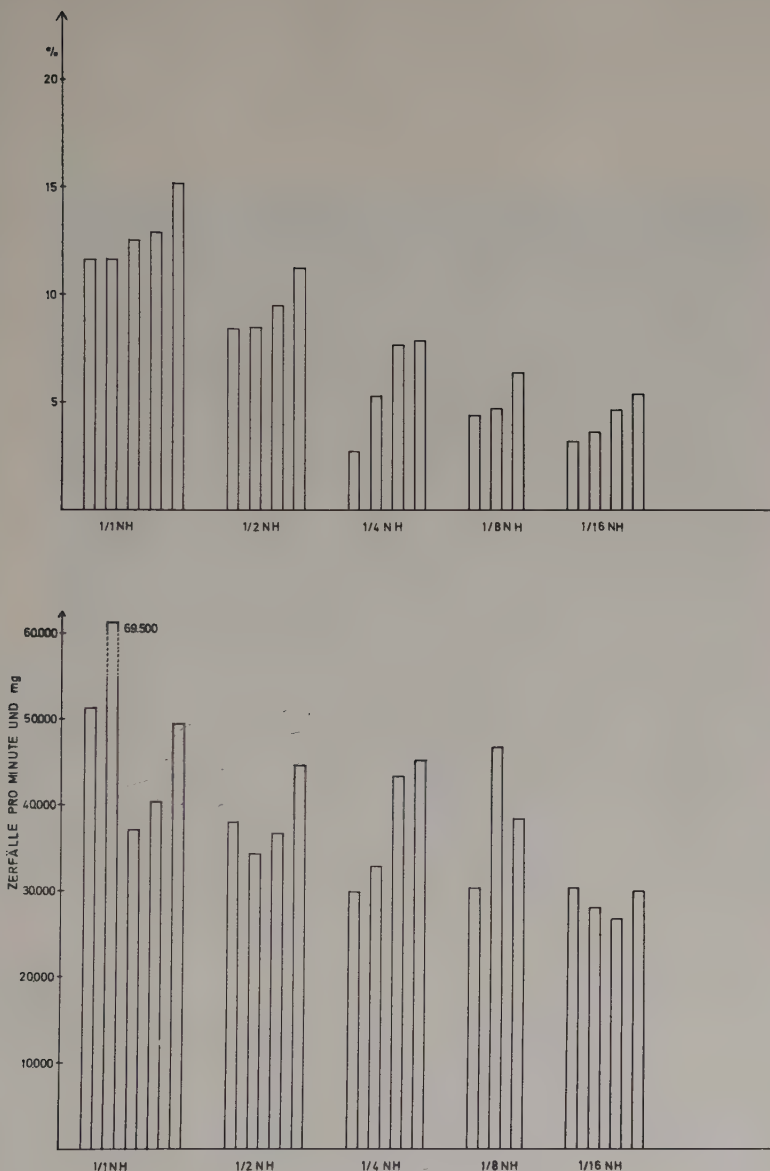


Abbildung 8: Markierungsindices (Prozentsatz markierter Hepatocyten) - oben - und Zerfälle pro Minute und Milligramm Trockengewicht - unten - von Lebergewebe teilhepatektomierter Ratten, die 36 Stunden lang mit abgestuften Konzentrationen von Nierenhomogenat dauerinfundiert wurden. Injektion von Thymidin- H^3 60 Minuten vor Tötung der Tiere.

Im ganzen gesehen ergibt sich in den Ergebnissen der Autoradiographie eine Übereinstimmung mit den Werten der Flüssigkeitsszintillationsmessung. Die Ergebnisse beider Methoden sind der besseren Vergleichsmöglichkeit wegen in der gleichen Reihenfolge untereinander angeordnet. Um die dargelegten Tendenzen besser erkennen zu können, wurden die Mittelwerte in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Neben der Flüssigkeitsszintillationsmessung des Lebergewebes wurde auch die des Nierengewebes durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Nach 24-stündiger Dauerinfusion mit Leberhomogenat weist das Nierengewebe der teilhepatektomierten Ratten im Durchschnitt eine höhere Zerfallsrate auf als das Nierengewebe von Ratten, die statt dessen mit Hanks-Lösung infundiert wurden, während bei Applikation von Nierenhomogenat in der Regel geringere Zerfallsraten ermittelt wurden. Bei 36-stündiger Versuchsdauer ist es umgekehrt. Die Zerfallsraten des Nierengewebes sind hierbei bei Infusion von Leberhomogenat geringer als die Werte von Ratten, denen Hanks-Lösung infundiert wurde, während die Werte bei Applikation von Nierenhomogenat über den Hanks-Werten liegen.

Zur Kontrolle wurden neben den teilhepatektomierten Tieren nicht operierte Tiere über 24 oder 36 Stunden mit Leberhomogenat dauerinfundiert. Die Ergebnisse mit der Flüssigkeitsszintillationsmethode ergeben für Lebergewebe sowohl bei 24-stündiger als auch bei 36-stündiger Versuchszeit eine niedrigere Zerfallsrate für alle Tiere, die mit Leberhomogenat behandelt wurden, als die entsprechenden Hanks-Werte. Außerdem ist es auffällig, daß bei den

24-Stunden-Werten diejenigen Tiere, die mit kleinen Homogenat-Konzentrationen infundiert wurden, eine stärkere Hemmung der Thymidinaufnahme aufweisen als die mit hohen Konzentrationen. Die autoradiographischen Untersuchungen der Leber ergeben ein ähnliches Bild. Sieht man von dem Tier mit 42 markierten Zellen auf 10000 Leberparenchymzellen und dem einen Hanks-Wert ab, bei dem unter den ausgezählten Zellen keine markierte Zelle gefunden wurde, so weisen alle Versuchstiere, denen Leberhomogenat infundiert wurde, eine geringere Anzahl von markierten Zellen auf als die Tiere, die mit Hanks-Lösung behandelt wurden. Die autoradiographischen Untersuchungen sind jedoch in diesem Fall, bedingt durch die geringe Zahl von markierten Zellen, nicht so aussagekräftig wie die durch die Verbrennungsmethode ermittelten Werte. Die Mittelwerte der Zerfallsraten des Nierengewebes sind entsprechend der geringeren DNS-Synthese-Aktivität dieses Organes kleiner als die der Leberwerte. Die große Streubreite der Einzelwerte läßt hier keine sicheren Deutungen zu.

Tabelle 1: Mittelwerte der Ergebnisse der Autoradiographie in Prozent markierter Hepatozyten (A) und der Flüssigkeitsszintillationsmessung in Zentrifugalfällen pro Minute und Milligramm Trockengewicht (B). Gewebe teilhepatektomierter Ratten, denen 24 oder 36 Stunden lang nach der Operation abgestufte Konzentrationen von Leberhomogenat (LH), Nierenhomogenat (NH) oder Hanks-Lösung injiziert wurde.

A. Autoradiographie

Infusions- dauer	Homo- genat	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Hanks
24 h	LH	13,76	12,16	13,71	13,84	14,72	
	NH	9,17	9,54	14,07	12,42	9,01	16,39
36 h	LH	6,84	6,54	4,07	3,73	11,62	
	NH	12,80	9,47	5,93	5,23	4,26	4,83

B. Verbrennungsmethode

Infusions- dauer	Homo- genat	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Hanks
24 h	LH	40800	33200	37300	52600	45500	
	NH	39100	34200	44000	47800	41800	47000
36 h	LH	37600	35700	30200	33400	39300	
	NH	49600	38600	38000	38800	28900	37700

Tabelle 2: Zerfälle pro Minute und Milligramm Trockengewicht von Nierengewebe teilhepatektomierter Ratten, denen 24 oder 36 Stunden lang abgestufte Konzentrationen von Leber- oder Nierenhomogenat infundiert wurde. Die Werte sind in derselben Reihenfolge geordnet wie die entsprechenden in den Säulengraphiken.

A. 24-stündige Dauerinfusion

Homogenat	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Hanks
Leber-homogenat	9200	8100	9350	7350	7750	9150
	8400	9100	7850	9450	7550	4200
	7700	7300	8150	12050	9950	8650
Mittelwert	8400	8200	8500	9600	8400	7900 9200
Nieren-homogenat	6750	6050	7750	8200	6900	
	9600	7400	7300	6900	4050	
	6900	8000 7550		8550	7950	
Mittelwert	7800	7300	7500	7900	6300	7800

B. 36-stündige Dauerinfusion

Homogenat	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Hanks
Leber-homogenat	8050	7300	7450	8300	6850	7600
	5850	6500	6450	9850	6800	8100
	9650	7350	7650	7500	8800	8550
	6800	6050	8100	6450	8900	8650
	11300					10200
Mittelwert	8300	6800	7400	8000	7800	7050 6700 9300
Nieren-homogenat	16650	11300	10000	9150	8150	
	12250	6550	7800	9900	10850	
	6750	11500	8750	8550	8350	
	13200	6500	9050		6700	
	11500					
Mittelwert	12000	9000	8900	9200	8500	8300

Tabelle 3: Ergebnisse des Kontrollversuches; diese Tiere wurden nicht teilhepatektomiert, sondern lediglich 24 oder 36 Stunden lang mit Leberhomogenat dauerinfundiert

A. Zahl der markierten Zellen auf 10000 Leberparenchymzellen

Infusionsdauer	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Hanks
24 h	5 42	1 1	0 0	1 0	0 2	7 0
36 h	0 1	2 1	0 0	1 0	0 0	7 8

B. Zerfälle des Lebergewebes pro Minute und Milligramm Trockengewicht

Infusionsdauer	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Hanks
24 h	13100 15950	7550 14650	7200 4900	8100 9300	2850 5950	9900 21700
Mittelwert	14500	11100	6100	8700	4400	15800
36 h	4200 9850	8150 8500	9750 11600	8900 8400	3400 9800	13900 8200
Mittelwert	7000	8300	10700	8700	6600	11100

C. Zerfälle des Nierengewebes pro Minute und Milligramm Trockengewicht

Infusionsdauer	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Hanks
24 h	6400 9000	7650 8950	6000 1850	5050 4200	1150 4700	4850 5150
Mittelwert	7700	8300	3900	4600	2900	5000
36 h	2100 6900	9700 4950	8800 5700	10250 5900	1650 5150	6250 5600
Mittelwert	4500	7300	7300	8100	3400	5900

V E R S U C H D

Untersuchungen an Ratten zur Frage der Aufnahme von radioaktiv markiertem Leber- oder Nierenhomogenat in verschiedene Organe des Organismus:

Spritzt man Spendertieren radioaktives Leucin, so wird es überall dort in den Organismus eingebaut, wo es für den Aufbau von Proteinen benötigt wird. Da der für die Steuerung der Leberregeneration postulierte Regulationsfaktor möglicherweise eine Proteinstruktur hat, könnte dieses Leucin in der Leber in den hypothetischen Regulationsstoff eingebaut werden. Er müsste dann als radioaktiv markierte Substanz in der Leber vorliegen. Stellt man von derart vorbehandelten Spendertieren ein Homogenat der Leber her, so könnte es sein, daß ein solcher nach Injektion in ein Empfängertier vermehrt in der Leber gebunden wird. Die vermehrte Bindung der markierten Substanz müßte sich in einer erhöhten Radioaktivität des Organes äußern. Dies wäre ein erster Hinweis für die Existenz des postulierten Stoffes. Da ein solcher Hemmstoff wahrscheinlich eine labile Struktur aufweist, ist es nötig, das Homogenat dem Organismus so anzubieten, daß die Substanz möglichst rasch und gleichmäßig im Körper verteilt wird. Dies wurde durch intrakardiale Verabreichung erreicht.

Versuchsbeschreibung:

Dieser Versuch wurde in zwei Varianten durchgeführt. Die Tiere beider Versuchsgruppen wurden nachmittags operiert; bedingt durch die unterschiedlichen Versuchszeiten wurden die Tiere jedoch zu verschiedenen Tageszeiten getötet.

1) Am Vortage des Versuches wurde 500 μC H^3 -Leucin zwei Spendertieren zweimal im Abstand von 8 Stunden intraperitoneal injiziert. Am nächsten Tag wurden aus Leber und Nieren in der schon beschriebenen Weise Ultrazentrifugate hergestellt. Den Versuchstieren wurde 0,1 oder 1,5 ml Leber- oder Nierenhomogenat intrakardial verabreicht; 15 Minuten, 2 Stunden und 20 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere getötet. Von folgenden Organen wurden je zwei Gewebstückchen für die Flüssigkeitsszintillationsmessung entnommen:

- 1) Herzspitze
- 2) rechte und linke Lungenspitze
- 3) unterer Rand des rechten und linken Leberlappens
- 4) Duodenum
- 5) unterer Pol beider Nieren
- 6) beide Nebennieren

Die Messung der Radioaktivität des injizierten mit H^3 -Leucin markierten Homogenates konnte als Flüssigkeit nicht in der üblichen Weise erfolgen. Durch Inkubation mit in 10-facher Menge zugesetztem Hyamin (Fa. Röhm und Haas) war es möglich, das Homogenat so aufzulösen, daß die für die Flüssigkeitsszintillationsmessung notwendige molekulare Größenordnung vorlag (HERBERG 1960). Die Messung ergab folgende Werte:

Leberhomogenat :	560000	Impulse/min/ml
Nierenhomogenat:	510000	" " "

Die Radioaktivität beider Homogenatarten ist also ungefähr gleich.

- 2) Diesmal wurden die Spendertiere viermal im Abstand von ungefähr 10 Stunden mit 500 μC H^3 -Leucin vorbehandelt. Dadurch, daß den Spendertieren die doppelte Menge radioaktives Leucin verabreicht wurde und außerdem die Homogenate nur mit halb so viel Hanks-Lösung versetzt wurden wie bei dem vorherigen Versuch, erhielten die Ultrazentrifugate bedeutend mehr Radioaktivität, was sich bei den Ergebnissen durch größere Impulsraten bemerkbar machte. So konnten die relativ großen Schwankungen zueinandergehöriger Werte, wie sie im ersten Teil des Versuches vorlagen, vermindert werden, die hauptsächlich wohl dadurch zustande kamen, daß die Impulszahl pro Organstückchen manchmal nur wenig vom Nullwert abwich. Allen Versuchstieren wurden 1,5 ml eines aus den Organen der Spender-tiere hergestellten Leber- oder Nieren-Ultra-zentrifugates intrakardial injiziert. Nach 10', 15', 30', 90', 4h, 9h und 16 Stunden wurden die Tiere getötet und ihnen die gleichen Gewebsproben wie unter 1) beschrieben entnommen. Es wurde die Eiweißkonzentration des Leber- und Nierenhomogenates nach der Biuret-Methode mit dem Eppendorf-Photometer bestimmt.

Eiweißkonzentration des Homogenat-Ultrazentrifugates

der Leber: 3,34 g/100 ml

der Niere: 3,05 "

Ergebnisse:

Die Ergebnisse des ersten Teils dieses Versuches D sind in der Tabelle 4, die des zweiten Teils in der Tabelle 5 zusammengefaßt. Allgemein ist zu ersehen, daß mit zunehmendem zeitlichem Abstand

der Homogenatgabe von der Tötungszeit der Tiere die Impulsrate bei allen Organen abfällt.

- 1) Bei Gabe von $0,1 \text{ cm}^3$ Homogenat im ersten Teil dieses Versuches sind, wohl wegen der geringen injizierten Menge radioaktiven Materials, die Tendenzen noch nicht so deutlich festzustellen. Dennoch weist die Niere nach Applikation von Nierenhomogenat zu allen drei Versuchszeitpunkten eine höhere Impulsrate auf als nach Verabreichung von Leberhomogenat, während Lebergewebe keinen solchen entsprechenden Effekt aufzeigt.

Lunge und Darm weisen bei kurzer Versuchsdauer gegenüber Herz und Nebenniere, aber auch der Leber eine höhere Radioaktivität auf. Bei der Verabreichung von $1,5 \text{ cm}^3$ Homogenat ist die Impulsrate entsprechend der größeren gespritzten Menge auch höher. Hier sind die Effekte, die eben aufgezeigt wurden, in der gleichen Weise vorhanden, nur treten sie stärker zu Tage. Die stärkste Aufnahme des radioaktiven Homogenates hat bei beiden Homogenatarten die Niere, wobei Nierenhomogenat jedoch bei dem 15-Minuten-Wert eine ungefähr doppelt so große Impulsrate bewirkt wie Leberhomogenat. Beim Lebergewebe sind wiederum keine solchen Tendenzen feststellbar. Die Lunge fällt wieder durch eine relativ hohe Impulsrate auf. Zur Verdeutlichung sind die Werte von Leber- und Nierengewebe der Versuchstiere, denen $1,5 \text{ cm}^3$ Homogenat gespritzt wurde, in Abbildung 9 aufgezeichnet worden.

- 2) Im zweiten Teil des Versuches konnten die gleichen Tendenzen beobachtet werden (Tabelle 5). Auch hier zeigt sich eine höhere Impulsrate des Nierengewebes

Tabelle 4: Impulse pro Minute und Milligramm
Trockengewicht verschiedener Organe von
Ratten, denen 15 Minuten, 2 Stunden und
20 Stunden vor dem Töten 0,1 oder 1,5 cm³
mit H³-Leucin markiertes Leberhomogenat
(LH) oder Nierenhomogenat (NH) intra-
kardial verabreicht wurde

Homogenat	Organ	15'	2 h	20 h
0,1 cm ³ LH	Herz	0,78	1,98	0,84
	Lunge	5,80	2,23	0,00
	Leber	1,31	2,35	0,75
	Darm	1,90	2,17	2,00
	Niere	2,64	1,12	0,71
	Neben- niere	0,77	0,93	1,66
0,1 cm ³ NH	Herz	0,66	1,04	0,83
	Lunge	3,59	1,86	0,78
	Leber	1,51	1,76	1,53
	Darm	5,54	2,59	0,65
	Niere	3,63	2,65	1,35
	Neben- niere	1,96	0,93	1,06
1,5 cm ³ LH	Herz	4,20	3,71	1,87
	Lunge	9,22	4,49	1,60
	Leber	3,41	3,52	1,12
	Darm	6,69	2,31	4,00
	Niere	14,02	5,97	2,17
	Neben- niere	3,16	3,40	2,92
1,5 cm ³ NH	Herz	4,99	2,15	1,85
	Lunge	9,44	3,87	2,50
	Leber	4,96	3,98	1,84
	Darm	3,55	3,59	4,00
	Niere	27,83	4,23	7,70
	Neben- niere	4,54	12,99	3,42

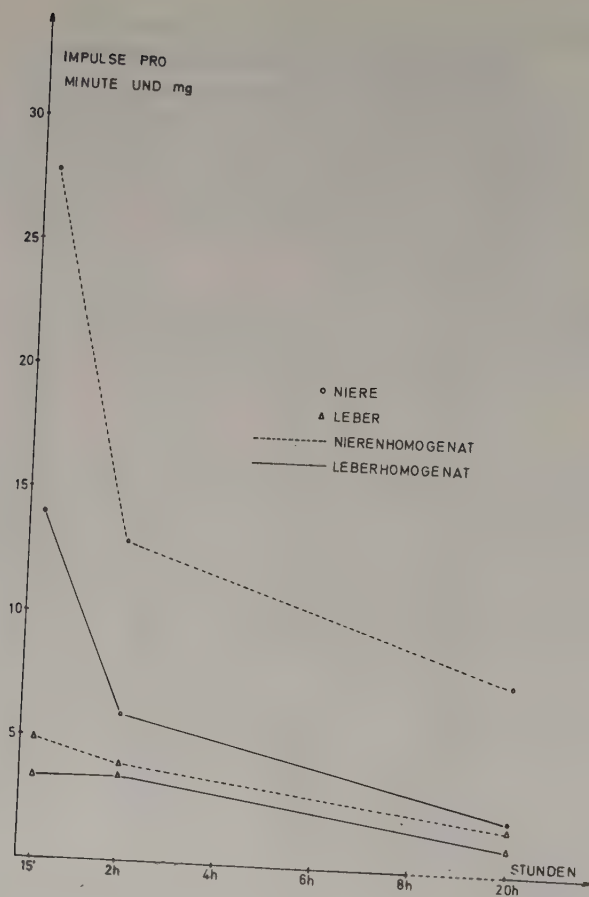


Abbildung 9: Impulse pro Minute und Milligramm Trockengewicht von Leber- und Nierengewebe von Ratten, denen 15 Minuten, 2 Stunden und 20 Stunden vor dem Töten mit H^3 -Leucin markiertes Leber- oder Nierenhomogenat intrakardial injiziert wurde.

bei Verabreichung von Nierenhomogenat gegenüber Leberhomogenat. Bei dem Tier, dem 15 Minuten vor dem Töten Leberhomogenat injiziert wurde, fallen die Werte gegenüber den Nachbarwerten (10 und 30 Minuten) ab. Dies könnte dadurch bedingt sein, daß ein Teil des Homogenates nicht in die Herzkammern, sondern in das Mediastinum gespritzt wurde. Dieser Fehler kann bei jedem Versuchstier aufgetreten sein, denn nur der Kontraktionsdruck des Herzens, der auf den Stempel der Tuberkulinspritze fortgeleitet wurde, gab in diesen Versuchen einen Anhalt dafür, ob die Nadelspitze sich im Herzen befand. Das Lungengewebe weist bei beiden Homogenatarten bei den Tieren, die kurz nach der Injektion getötet wurden, die höchste Impulsrate aller Organe auf. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, daß durch die Versuchstechnik nicht festgestellt werden konnte, ob das Homogenat ins rechte oder linke Herz gespritzt wurde und so eventuell eine verhältnismäßig zu hohe Aufnahme der Lunge erfolgen konnte, die sich natürlich besonders bei kurzer Versuchsdauer bemerkbar macht. Zur besseren Übersicht wurden auch hier die Leber- und Nierenwerte nochmals gesondert in einer graphischen Darstellung zusammengefaßt (Abbildung 6).

IV. B E S P R E C H U N G D E R E R G E B N I S S E

Wie bei anderen biologischen Wachstumsvorgängen beruht die Reparatur des durch die Teilhepatektomie verursachten Gewebsverlustes auf der Fähigkeit der Zellen, ihr genetisches Material durch Reproduktion der DNS zu verdoppeln. Daß an der Regenerationssteuerung humorale Faktoren beteiligt sind, konnte schon häufig aufgezeigt werden. Sowohl bei Parabioseversuchen mit teilhepatektomierten Tieren als auch bei Verabreichung von Leberhomogenat und Serum nach Teilhepatektomie finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben darüber, ob die DNS-Synthese der Leber eine Stimulierung erfährt oder eine Hemmung zeigt, oder ob kein Einfluß auf die Regeneration zu beobachten ist. Während SAETREN (1956), BADE und ECHAVE LLANOS (1962) eine Hemmung der Leberregeneration durch homologe Organhomogenate fanden, zeigten die Ergebnisse von MAC JUNKIM und BREUHAUS (1931) und BLOMQUIST (1957) eine fördernde Reaktion. TEIR und LAHTIHARJU (1961) beobachteten bei teilhepatektomierten Ratten, denen 24 Stunden nach der Operation Homogenat aus bei der Operation entnommenem und bei 37° C inkubiertem Lebergewebe injiziert wurde, einen Anstieg der Mitosen. WILSON und LEDUC (1947) jedoch verzeichneten eine hemmende Wirkung auf die Leberregeneration nach Applikation von Homogenat normaler Leber erwachsener Tiere. WRBA und GIESSLER (1963) konnten wiederum durch Zufuhr von homologem Organbrei eine Steigerung der Phosphataufnahme in die Leber erzielen. Wenn solche regenerationsfördernde oder regenerationshemmende Faktoren in der Leber gebildet werden

und diese über das Blutsystem wirksam werden sollen, müssen diese Faktoren auch dort selbst nachweisbar sein. Die Ergebnisse sind aber genauso verwirrend und uneinheitlich wie bei Verabreichung von Homogenaten. FRIEDRICH-FRESKA und ZAKI (1954) fanden als erste eine erhöhte Mitoserate in der normalen Leber bei intraperitonealer Verabreichung von Serum teilhepatektomierter Ratten, während die Gabe von Serum unbehandelter Tiere keine Wirkung zeigte. Nach LEONG und Mitarb. (1963) dagegen beeinflußt Serum die Mitoserate nicht. Die widersprüchlichen Angaben in der Literatur sind zum Teil auf die unterschiedlichen Techniken und möglicherweise auf Ungenauigkeiten der Meßmethoden zurückzuführen. So kann beispielsweise die Bestimmung des Mitoseindex auf Grund tageszeitlicher Schwankungen zu Fehldeutungen führen (PETERS 1962). Daher wurden die vorliegenden Untersuchungen nach zwei verschiedenen Methoden durchgeführt.

Die Flüssigkeitsszintillationsmessung hat gegenüber der autoradiographischen Untersuchung den Vorteil einer Schnellmethode, aber den Nachteil der ungenaueren Bestimmung. Bei der Autoradiographie wird der Meßfehler zum größten Teil durch die Zählmethode, zum kleineren Teil durch die autoradiographisch-histologische Technik bestimmt. Die Bewertung der Flüssigkeitsszintillationsmethode wird neben den meßtechnischen Faktoren dadurch ungenau, daß auch Thymidin-Inkorporation in Zellen, die keine Parenchymzellen sind, mitgemessen werden. Der Anteil der Parenchymzellen der Leber macht nur 60 - 65 % der Leberzellpopulation aus (KASTERLITZ 1958).

Auch die Verzögerung der Regeneration der Gallengangsepithelien, der Sinusendothelien und der Kupffer'schen Sternzellen gegenüber den Parenchymzellen (GRISHAM 1962; OEHLERT 1963) muß bei der Bewertung der Radioaktivitätswerte berücksichtigt werden. Obgleich die Verfügbarkeitszeit von H^3 -Thymidin für den Einbau in die DNS nur 40 Minuten beträgt, ist danach die Radioaktivität des nicht-inkorporierten Thymidins nicht völlig aus dem Gewebe eliminiert. Dieses wird zu Substanzen wie z. B. Thymin abgebaut. Die Meßwerte der Verbrennungsmethode sind daher relativ zu hoch und lassen sich nur bedingt mit den Ergebnissen der Autoradiographie vergleichen; letztere besitzen also eine größere Aussagefähigkeit als die mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsmethode gewonnenen Werte.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte eine Zeitabhängigkeit der Regeneration von der Homogenatgabe nach Teilhepatektomie beobachtet werden; mit zunehmendem zeitlichem Abstand zwischen Verabreichung von Leberhomogenat und Untersuchung der Leber wird gegenüber der Gabe von Nierenhomogenat ein fördernder Einfluß sichtbar. Die Markierungsindices bei Applikation sowohl des Nieren- als auch des Leberhomogenates liegen jedoch unter den aus der Literatur (STÖCKER 1966) bekannten Werten lediglich teilhepatektomierter Tiere. Auch RABES (1967) stellte fest, daß der Zeitpunkt der humoralen Einflußnahme auf die Regeneration von Bedeutung ist. Er fand in seinen Versuchen, daß nach Abschluß der Präsynthesephase (16 Stunden nach der Teilhepatektomie) die DNS-Synthese unabhängig von Einflüssen des Organismus abläuft. Die Ergebnisse bei Injektion von Leberhomogenat 15 Minuten nach

der Teilhepatektomie sind unterschiedlicher Art, zum Teil wirkte Leberhomogenat stark inhibierend, zum anderen Teil gegenüber Nierenhomogenat stimulierend auf die Leberregeneration. Offenbar ist in diesen Versuchen ein im Homogenat enthaltener Hemm- oder Stimulierungsstoff in der einen Gruppe der Versuchstiere wirksam, in der anderen Gruppe nicht wirksam geworden.

Auch die unterschiedlichen Markierungsindices des Lebergewebes nephrektomierter Ratten, denen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation Leber- oder Nierenhomogenat verabreicht wurde, deuten darauf hin, daß der Zeitpunkt der Homogenatgabe für die Reaktion des Lebergewebes von Bedeutung ist. Die durchweg erhöhte Zahl von markierten Hepatozyten bei Gabe von Leber- oder Nierenhomogenat gegenüber lediglich nephrektomierten Kontrolltieren ist nur schwer zu erklären, zumal die Streßsituation, wie sie die Nephrektomie darstellt, die Mitoserate hemmen sollte (BULLOUGH 1952), möglicherweise aber durch die funktionelle Belastung der Leber durch erhöhte Entgiftungsaufgaben hervorgerufen wird.

Auch bei Injektion von Homogenat in dreistündigen Abständen sind die Markierungsindices sowohl bei Gabe von Leber- als auch von Nierenhomogenat geringer als die der entsprechenden Kontrolltiere, wobei jedoch Leberhomogenat bei allen vier Versuchszeitpunkten (15, 20, 25 und 30 Stunden) einen relativ schwächeren depressiven Einfluß ausübt. Die Zahl DNS-synthetisierender Hepatozyten ist bei allen Versuchsansätzen 25 Stunden nach der Operation am höchsten. Homogenatgabe bewirkt also unter den

gewählten Versuchsbedingungen keine zeitliche Verschiebung der Regeneration wie etwa eine Hypophysektomie (RABES und Mitarb. 1965). Der gleiche Befund ergibt sich nach Teilhepatektomie mit anschließender Dauerinfusion über 24 Stunden gegenüber Kontrolltieren, die mit Hanks-Lösung infundiert wurden. Auch hierbei weisen die Kontrolltiere, die mit Hanks-Lösung infundiert wurden, gegenüber den Tieren, denen nach der Operation Leber- oder Nierenhomogenat verabreicht wurde, den höchsten Prozentsatz markierter Hepatozyten auf. Desgleichen ist der hemmende Effekt auf die Leberregeneration durch Leberhomogenat geringer als durch die Einwirkung von Nierenhomogenat. Die verschiedenen Konzentrationen von Leberhomogenat zeigen keinen signifikanten unterschiedlichen Effekt, während die abgestuften Homogenatkonzentrationen von Nierengewebe zu verschieden hohen Markierungsindices in der Leber führen, die jedoch keine ganz einheitliche Tendenz erkennen lassen.

Bei 36-stündiger Versuchszeit sind die Ergebnisse umgekehrt: die Markierungsindices in der Leber derjenigen Tiere, die mit Nierenhomogenat behandelt wurden, sind höher als die der Tiere, die mit Leberhomogenat infundiert wurden. Die Werte nach Infusion von Leberhomogenat in einer Konzentration von 1/16 des Stammhomogenates machen aus bisher noch nicht erklärbaren Gründen eine Ausnahme. Der bei den 24-Stunden-Werte erkennbare hemmende Einfluß der Homogenate, besonders der Niere, wird also durch eine später erfolgende höhere Regenerationsrate kompensiert. Die bei 24-stündiger

Versuchsdauer feststellbare Hemmung ist also nicht absolut; es findet vielmehr nur eine zeitliche Verschiebung des Regenerationsmaximums statt. Unter dem Einfluß beider Homogenatarten zeigen sich nach 36-stündiger Versuchsdauer mit abfallender Konzentration niedrigere Markierungsindices, wobei Leberhomogenat in einer Konzentration von 1/16 des Stammhomogenates auch hier eine Ausnahme macht. Es besteht also eine Abhängigkeit der Reaktion von der Zufuhr der Homogenatmenge. Daß dieser Effekt bei 24-stündiger Dauerinfusion nicht zu beobachten ist, könnte auf eine Reihe von unspezifischen Einflüssen zurückzuführen sein, die mit der Operation in direktem Zusammenhang stehen. In Streßsituationen wird von der Hypophyse vermehrt ACTH abgegeben, welches in der Nebennierenrinde besonders die Ausschüttung von Cortisol aktiviert. ACTH, Cortisol und andere Nebennierenhormone bewirken eine Hemmung der Regeneration (EINHORN und Mitarb. 1954; GUZEK 1964; DAVIS and HYDE 1966).

24-stündige Infusion mit Leberhomogenat bewirkt in allen Konzentrationen bei unbehandelten Tieren im Mittel eine niedrigere Zerfallsrate des Lebergewebes als die Gabe von Hanks-Lösung; das gleiche gilt für 36-stündige Versuchsdauer. Auch bei diesen Kontrolltieren wird also der humorale Einfluß von Leberhomogenat auf die Regeneration der Leber erkennbar. Die Zerfallsraten von Nierengewebe dieser Tiere streuen um die Werte nach Infusion von Hanks-Lösung und lassen keinen besonderen Effekt erkennen.

Nierengewebe weist bei allen teilhepatektomierten Tieren nach 24-stündiger Infusion mit Leberhomogenat eine höhere Zerfallsrate auf als der entsprechende Hanks-Wert, nach Infusion mit Nierenhomogenat

jedoch eine geringere. Dies könnte so gedeutet werden, daß Proteinzufuhr als unspezifisches Stimulans Nierengewebe in seiner Proliferation anregt und daß Nierenhomogenat spezifisch eine hemmende Wirkung hat. Daß keine Abhängigkeit von der Konzentration des Homogenates festzustellen ist, mag auf dieselben unspezifischen Einflüsse zurückzuführen sein, die weiter oben schon erwähnt wurden. Bei 36-stündiger Versuchsdauer lassen sich niedrigere Zerfallsraten mit fallender Konzentration aufzeigen. Die erhöhten Werte bei Zufuhr von Nierenhomogenat könnten auch diesmal dadurch erklärt werden, daß die bei 24-stündiger Dauerinfusion erkennbare hemmende Wirkung später durch größere Regenerationsrate kompensiert wird; möglicherweise ist sie aber auch dadurch bedingt, daß die wirksamen Stoffe des Nierenhomogenates umgebaut wurden.

MARSAK und WALKER (1945) und TEIR und RAVANTI (1953) konnten zeigen, daß in Form von Homogenat angebotene Nukleinsäure-Bausteine der Leber organspezifisch eingebaut werden; entsprechendes konnten WALKER und Mitarb. (1956) nach Injektion von mit S ³⁵ markiertem Organbrei aus Herz und Leber finden. Eine solche Anreicherung konnte in dieser Arbeit bei intrakardialer Verabreichung von H ³ -Leucin-markiertem homologem Homogenat für Lebergewebe nicht nachgewiesen werden, wohl aber für Nierengewebe. Daß dieser spezifische Einbau nicht bei Injektion von Leberhomogenat erfolgte, mag zwei Ursachen haben. Erstens können die Stoffe, die in der Leber eingebaut werden, kein oder nur sehr wenig Leucin enthalten, was für einige Proteine nachgewiesen ist, (RAUEN 1956). Die zweite, wahrscheinlichere Möglichkeit wäre, daß die Enzyme der Leber selbst, die in diesem Organ als dem bedeutendsten Stoffwechselort des Organismus in besonders hoher Aktivität vorhanden sind

und bei der Homogenisierung freigesetzt werden, die Strukturen der leucinmarkierten Proteine so verändern, daß diese ihre spezifische Wirksamkeit und Organaffinität verlieren. Aus einer Reihe von Versuchsergebnissen anderer Autoren (RABES 1968) und aus den eigenen Befunden nach Injektion von Nierenhomogenat läßt sich trotz des negativen Ergebnisses mit Leberhomogenat mit gewisser Wahrscheinlichkeit folgern, daß eine spezifische Affinität von Organsubstraten zum homologen Organ existiert und möglicherweise bei der Regulation der Zellhomöostase im Sinne des Konzeptes von WEISS (1952) Bedeutung hat.

In den verschiedenen Versuchen ist übereinstimmend ein fördernder Einfluß bei Injektion von Leberhomogenat gegenüber Nierenhomogenat nach Teilhepatektomie zu finden. Die Verabreichung von Leberhomogenat an unbehandelte Tiere dagegen bewirkt eine Depression der DNS-Synthese. Die Ausgangslage des Organismus scheint damit einen entscheidenden Einfluß auf die Wirksamkeit der Homogenatinjektion zu haben. Dies würde auch die unterschiedlichen, sich anscheinend widersprechenden Aussagen in der Literatur erklären. Das in der Einleitung erwähnte Prinzip der negativen Rückkopplung ist daher vielleicht nur ein Teilsystem einer komplexen Regenerationssteuerung. Die Ergebnisse berechtigen eher zu dem Schluß, daß die Regeneration der Leber durch ein multifaktorielles System kontrolliert wird, an dem sowohl hemmende als auch fördernde Faktoren beteiligt sind. Auch die Ergebnisse von SHORT und Mitarb. (1969) weisen darauf hin, daß mehrere Faktoren an der

Regulation der Organregeneration beteiligt sind. Bei Injektion von β -Globulinen fanden diese Autoren einen Anstieg der DNS-Synthese in der Leber, während die α -Globulin-Fraktion keine Wirkung erkennen ließ. Wurden beide Fraktionen zusammen appliziert, ergab sich die größte DNS-Synthese-Aktivität.

Die Umstellung der Leber von funktionellen Aufgaben auf die Proliferation ruft eine ganze Reihe histochemisch und histologisch faßbarer Veränderungen hervor, so Vergrößerung der Leberepithelzellen mit Na-Anstieg, Erniedrigung des Glykogengehaltes, Lipidanstieg mit Fetttropfenbildung, Mitochondrien-schwellung als Ausdruck einer allgemeinen Zellschädigung, Aktivitätsanstieg zahlreicher Enzyme, welche mit der Nukleinsäuresynthese zusammenhängen, Vermehrung der diploiden Zellkerne, Bildung von Eiweißtropfen, um nur einige der bemerkenswertesten Veränderungen an der Leber selbst aufzuzählen, die wohl zum Teil lediglich Operationsfolge (Schock, Zirkulationsänderung, Überbelastung der Restleber) sind und mit dem eigentlichen Proliferationsgeschehen nur indirekt zusammenhängen (GLINOS 1968; GRUNDMANN und BACH 1960; ALTMANN 1966; SIEBERT 1966). Die Abgrenzung von spezifischen, für die Proliferation essentiellen Veränderungen an der Leberzelle gegenüber unspezifischen Schäden ist in der Regel nicht möglich. Voraussetzung für den Beginn der DNS-Synthese ist in jedem Fall jedoch eine Synthese und Aktivierung von spezifischen Enzymen, die in der normalen Ruheleber nicht oder nur in geringer Aktivität nachweisbar sind. Wenn schon die Steuerung einer einzelnen Enzymsynthese oder

Aktivierung eines Enzyms in einem komplizierten Wechselspiel hemmender und fördernder Faktoren abläuft, wofür an Mikroorganismen in letzter Zeit Hinweise gewonnen wurden, ist es zumindest wahrscheinlich, daß auch die Regeneration eines ganzen Organs, wie die der Leber nach $2/3$ -Hepatektomie, durch ein ebenso vielfältiges oder noch komplexeres Gefüge gesteuert wird. Für diese Annahme ergeben sich auch aus den Ergebnissen Hinweise.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

An insgesamt 230 männlichen Wistar-AF/HAN-Ratten (175 - 195 g Körpergewicht) wurden Untersuchungen zur Beeinflussung der DNS-Synthese-Aktivität der Leber und Niere nach partieller Hepatektomie, Nephrektomie und Scheinlaparotomie durchgeführt. In verschiedenen Intervallen nach der Operation wurden Homogenate von Leber und Niere einmal oder mehrfach in dreistündigen Abständen injiziert oder Dauerinfusionen von Homogenaten gegeben. Die Wirksamkeit der Behandlung wurde durch Flüssigkeitsszintillationsmessung der Radioaktivität des Gewebes und durch autoradiographische Bestimmung des Markierungsindex der Hepatozyten nach einmaliger Applikation von tritiiertem Thymidin 60 Minuten vor dem Tod der Tiere quantitativ erfaßt. Zur Bestimmung einer organspezifischen Aktivität von Organfraktionen wurde radioaktiv markiertes Organhomogenat injiziert und seine Verteilung im Organismus gemessen. Es ergaben sich folgende Befunde:

1. Die Regeneration der Leber nach Teilhepatektomie wird durch einmalige Gabe von Leberhomogenat 15 Minuten nach der Operation im Vergleich zu Kontrolltieren gehemmt. Mit zunehmendem zeitlichem Abstand appliziertes Homogenat (Versuchszeitpunkte: 15 Minuten, 2 und 8 Stunden) übt eine schwächere Hemmwirkung aus. Nierenhomogenat bewirkt eine stärkere Repression unabhängig vom Zeitpunkt der Applikation. Die Thymidin- H^3 -Markierungsindices der Hepatozyten von Ratten, denen

nach Nephrektomie Nieren- oder Leberhomogenat injiziert wurde, sind, je nach dem Zeitpunkt der Homogenatgabe (15 Minuten, 2 und 8 Stunden nach der Operation) höher als bei scheinoperierten Tieren. Der Zeitpunkt der Homogenatgabe scheint für den Ablauf und die Intensität der Regeneration von Bedeutung zu sein.

2. Sowohl Leberhomogenat als auch Nierenhomogenat bewirkt bei mehrfacher Injektion in dreistündigen Abständen nach Teilhepatektomie gegenüber Kontrolltieren zu allen vier untersuchten Zeiten (15, 20, 25 und 30 Stunden nach der Operation) eine hemmende Wirkung. Leberhomogenat bewirkt eine geringere Hemmung als Nierenhomogenat, was auf die gleichzeitige Existenz eines stimulierenden Faktors im Leberhomogenat zurückgeführt werden könnte.
3. Bei Infusion von Organhomogenaten über einen längeren Zeitraum streuen zueinandergehörige Werte sehr. Dies wird vor allem auf unspezifische Einflüsse (Streßsituation durch partielle Fixierung der Ratten) zurückgeführt. Dennoch läßt sich folgendes aussagen:
Nach 24-stündiger Infusion mit verschiedenen Konzentrationen von Nierenhomogenat kann bei teilhepatektomierten Tieren wiederum eine stärkere Hemmung der Leberregeneration beobachtet werden als bei Gabe von Leberhomogenat. Die Kontrolltiere, denen Hanks-Lösung appliziert wurde, weisen höhere Markierungsindices auf als die Tiere, denen Leber- oder Nierenhomogenate verabreicht wurde. Signifikante Hinweise für eine Abhängigkeit

von der Konzentration konnten nicht gefunden werden.

Beim gleichen Versuch mit 36-stündiger Dauer sind bei Infusion mit Homogenat durchweg höhere Markierungsindices festzustellen als bei Gabe von Hanks-Lösung. Bei beiden Homogenatarten sind mit abnehmender Konzentration fallende Markierungsindices zu beobachten, wobei die Werte nach Nierenhomogenat fast immer über den nach Gabe von Leberhomogenat ermittelten Werten liegen.

Die Infusion unbehandelter Tiere über 24 oder 36 Stunden mit Leberhomogenat bewirkt eine verminderte Aufnahme von Thymidin in die Leber gegenüber Tieren, die Hanks-Lösung erhielten. Die Inkorporation von Thymidin in die Niere liegt in der Größenordnung der entsprechenden Kontrolltiere.

4. Ein organspezifischer Einbau von H^3 -Leucin-markiertem Nierenhomogenat konnte mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsmethode nachgewiesen werden, nicht jedoch ein entsprechender Einbau der markierten Proteine aus Leberhomogenat in die Leber.
5. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die Regulation der Leberzellproliferation durch einen einzigen organspezifischen Faktor erfolgt. Die Ergebnisse berechtigen eher zu dem Schluß, daß die Regeneration der Leber durch ein multifaktorielles System hemmender und fördernder Substanzen gesteuert wird.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Altmann, H.W.:

Der Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 15 - 51 (1966).

Antoni F., G.J. Köteliš, K. Hempel und W. Maurer:

Über die Eignung verschiedener Fixationen und perchlorsäurehaltiger Lösungen für autoradiographische Untersuchungen des RNS-, DNS- und Proteinstoffwechsels.

Histochemie 2, 210 - 220 (1965).

Bade, E.G.:

Biphasic response of mitotic activity of regenerating liver tissue homogenates.

Naturwissenschaften 53, 42 - 43 (1966).

Bade, E.G. und J.M. Echave Llanos:

Lebermitosehemmung durch Homogenate regenerierender Leber.

Naturwissenschaften 49, 351 - 352 (1962).

Baillie, L.A.:

Determination of liquid scintillation counting efficiency by pulse height shift.

Int. J. appl. Rad. Isot. 8, 1 - 7 (1960).

Blomquist, K.:

Growth stimulation in the liver and tumor development following intraperitoneal injections of liver homogenates in the rat. Acta path. microbiol. Scandinav. Suppl. 121 (1957).

Blum, J. E.:

Zur Beeinflussung Stress-bedingter Magenulcera
durch Psychopharmaka.

In: Wissenschaftlicher Dienst " Roche "

Kranksein in seiner organischen und psychischen
Dimension, 115 - 120 (1968).

Bonfils, S.:

Emotionen und experimentelle Ulcusentstehung.

In: K. FELLINGER: Funktionsabläufe unter
emotionellen Belastungen.

Symposium Wien 1963, 127 - 144

Karger, Basel (1964).

Bray, G. A.:

A simple efficient liquid scintillator for
counting aqueous solutions in a liquid
scintillation counter.

Anal. Chem. 1, 279 - 285 (1960).

Büchner, F.:

Die experimentelle Kanzerisierung der Paren-
chymzelle in der Synopsis klassischer und
moderner morphologischer Methoden.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 45, 37 - 59 (1961).

Bucher, N. L. R., M. N. Swaffield and J. F. DiTroia:

The influences of age upon the incorporation
of thymidine-2-C¹⁴ into the DNA of regenerating
rat liver.

Cancer Res. 26, 509 - 512 (1964).

Bullough, W. S.:

Stress and epidermal mitotic activity.

I. The effects of the adrenal hormones.

J. Endocrinol. 8, 265 (1952).

Busch, H.:

Methods in Cancer Research II, p. 244.
Academic Press New York - London (1967).

Davis, J. C. and T. A. Hyde:

The effect of corticosteroids and altered
adrenal function on liver regeneration
following chemical necrosis and partial
hepatectomy.
Cancer Res. 26, 217 - 220 (1966).

Einhorn, S. L., E. Hirschberg and A. Gellhorn:

Effects of cortisone on regenerating rat liver.
J. Gen. Phys. 37, 559 - 574 (1954).

Friedrich-Freska, H. und F. G. Zaki:

Spezifische Mitoseauslösung in normaler
Rattenleber durch Serum von partiell hepatekto-
mierten Ratten.
Z. Naturforsch. 9b, 394 - 397 (1954).

Glinos, A. D.:

The mechanism of liver growth and regeneration.
In: Mc Elroy, W. D. and B. Glass, Edit.:
A symposium on the chemical basis of deve-
lopment.
John Hopkins Press, Baltimore (1958).

Grisham, J. W.:

Inhibitory effect of tritiated thymidine
on regeneration of the liver in the young
rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 105,
558 - 558 (1960).

Grisham, J. W.:

A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; Autoradiography with thymidine- H^3 .
Cancer Res. 22, 842 - 849 (1962).

Grundmann, E. und G. Bach:

Amitosen, Endomitosen und Mitosen nach partieller Hepatektomie.
Beitr. path. Anat. 123, 143 - 172 (1960).

Gundmann, E. und H. J. Seidel:

Parenchymregeneration der Leber nach Teilhepatektomie.
Handbuch der allgem. Path.
VI,2 Regeneration, Hyperplasie, Cancerisierung
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1969).

Guzek, J. W.:

Effect of adrenocorticotrophic hormone and cortisone on the uptake of tritiated thymidine by regenerating rat liver tissue in the white rat.
Nature 21, 930 - 931 (1964).

Herberg, R. J.:

Determination of carbon-14 and tritium in blood and other whole tissues.
Liquid scintillation counting of tissues.
Anal. Chem. 32, 42 - 46 (1960).

Higgins, G. M. and R. M. Anderson:

Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.
Arch. Path. 12, 186 - 202 (1931).

Holzer, H.:

Intrazelluläre Regulation des Stoffwechsels.
Naturwissenschaften 50, 260 - 270 (1963).

Jaffé, J. J.:

Diurnal mitotic periodicity in regenerating
rat liver.

Anat. Rec. 120, 935 - 954 (1954).

Kalberer, F. und J. Rutschmann:

Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Tritium,
Radiokohlenstoff und Radioschwefel in beliebigem
organischen Probenmaterial mittels des
Flüssigkeits-Scintillations-Zählers.

Helv. Chim. Acta 44, 1956 - 1966 (1961).

Kasterlitz, H. W.:

In: Liver function (R. W. Brauer, ed.)

Publ. No 4, Washington D. C.:

Amer. Inst. Biol. Sci. (1958).

Koburg, E. und B. Schultze:

Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -
Thymin über die Dauer der DNS-Synthese,
der Ruhephase und der Mitose bei proliferierenden
Systemen wie den Epithelien des Darmes, des
Oesophagus und der Cornea der Maus.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 45, 103 - 107 (1961).

Leong, G. F., J. W. Grisham and B. Hole:

Effect of rapid, " total " exchange transfusion
on hepatic DNA synthesis in partially hepatectomized
rats.

Fed. Proc. 22, 192 (1963).

Mc Junkim, F. A. and H. C. Breuhaus:

Homologous liver as a stimulans to hepatic regeneration.

Arch. Path. 12, 900 - 908 (1931).

Marshak, A. and A. C. Walker:

Effect of liver fractions on mitosis in regenerating liver.

Am. J. Physiol. 143, 226 (1945).

Maurer, W. und E. Koburg:

Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Thymidin über den zeitlichen Ablauf der DNS-Synthese bei den Epithelien des Darmes und anderer Zellarten der Maus.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 45, 108 - 113 (1961).

Maurer, W. und E. Primbsch:

Größe der β -Selbstabsorption bei der 3H -Autoradiographie.

Exp. Cell Res. 33, 8 - 18 (1964).

Oehlert, W.:

Autoradiographische Untersuchungen zur physiologischen, reparativen und pathologischen Regeneration.

Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung 5, 525 - 544 (1963).

Peters, R.:

Die Mitosehäufigkeit in der Rattenleber in Abhängigkeit von der Tageszeit, dem Gewicht der Tiere und der Ernährung.

Z. Naturforsch. 17b, 164 - 168 (1962).

Rabes, H.:

Untersuchungen zur humoralen Regulation bei regenerativem und malignem Wachstum.

Veröff. morphol. Path. 73, 1 - 125

Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart (1967).

Rabes, H.:

Demonstration and analysis of organ specificity of tissue extracts by radioactive tracer methods.

Sym. Int. Soc. Cell. Biol. 7, 147 - 164 (1968).

Rabes, H. und H. V. Tuzcek:

Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberproliferation nach partieller Hepatektomie.

Virch. Arch. Ab. B Zellpath. 6, 302 - 312 (1970).

Rabes, H., H. Wrba, M. Eder und H. Brändle:

DNS-Synthese und Cytoplasmaveränderungen bei der Leberregeneration nach Hypophysektomie.

Z. Naturforsch. 20b, 607 - 608 (1965).

Rauen, H. M.:

Biochemisches Taschenbuch

Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1956).

Reichard, P. and P. Estborn:

Utilization of deoxyribosides in synthesis of polynucleotides.

J. Biol. Chem. 188, 839 - 846 (1951).

Saetren, H.:

A principle of auto-regulation of growth production of organ specific mitose-inhibitors in kidney and liver.

Exp. Cell Res. 11, 229 - 232 (1965).

Schultze, W. and W. Oehlert:

Autoradiographic investigation of incorporation of H^3 -thymidine into cells of the rat and mouse.

Science 131, 737 - 738 (1960).

Short, J., R. Zemel, J. Kanta and I. Lieberman:

Stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver parenchymal cells in the intact rat.

Nature 223, 956 - 957 (1969).

Siebert, G.:

Steuerung und Energetik der Zellregeneration in biochemischer Sicht.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 119 - 132 (1966).

Stöcker, E.:

Der Proliferationsmodus in Niere und Leber.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 53 - 74 (1966).

Teir, H. and A. Lahtiharju:

Effect on necrotic liver on regeneration in hepatectomized rats.

Exp. Cell Res. 24, 424 - 428 (1961).

Teir, H. and K. Ravanti:

Mitotic activity and growth in the liver of the white rat.

Exp. Cell Res. 5, 500 - 507 (1953).

Wagner, R.:

Rückkopplung und Regelung, ein Urprinzip des Lebendigen.

Verh. Dtsch. Ges. Naturforsch. u. Ärzte, 61 - 72 (1960).

- Walter, H., D. W. Allman and H. R. Mahler:
Influence of adult tissue homogenates on
formation of similiar embryonic proteins.
Science 124, 1251 - 1252 (1956).
- Weinbren, K. and E. Tarsh:
The mitotic response in the rat liver after
different regenerative stimuli.
Brit. J. exp. Path. 45, 475 - 480 (1964).
- Weiss, P.:
Self-regulation of organ growth by its own
products.
Science 115, 487 - 488 (1952).
- Wilson, J. W. and E. H. Leduc:
Mitotic rate in the mouse liver following
intraperitoneal injection of liver, kidney
and egg yolk.
Anat. Rec. 97, 470 - 494 (1947).
- Wrba, H. und G. Giessler:
Stoffwechselsteigerung in der Leber durch
Zufuhr von homologem Organbrei.
Naturwissenschaften 50, 96 - 97 (1963).

Herrn Professor Dr. med. RABES danke ich
sehr herzlich für die Anregung zu dieser
Arbeit, für sein stets förderndes Interesse
an ihrem Fortgang und für viele wertvolle Rat-
schläge bei ihrer Durchführung.

Lebenslauf

Am 20. Februar 1943 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Hugo Schillings und seiner Frau Therese, geborene Merges, in Marburg an der Lahn geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Neuss wechselte ich auf das dortige Städtische Theodor-Schwann-Gymnasium über, wo ich 1964 die Reifeprüfung bestand. Nach einjähriger Tätigkeit auf der Deutschen Bank in Düsseldorf entschloß ich mich zum Studium der Medizin, das ich 1965 in München begann. Dort bestand ich im Frühjahr 1966 die naturwissenschaftliche und im Sommer 1967 die ärztliche Vorprüfung. Ab Sommersemester 1970 studierte ich an der Universität Düsseldorf, wo ich 1971 das Studium mit dem medizinischen Staatsexamen beendete.

